



ISSN 1859-4794

TẠP CHÍ

KHOA HỌC & CÔNG NGHỆ Việt Nam

**Vietnam Journal of
Science and Technology - MOST**

B

Tập 63 - Số 5 - Tháng 5 năm 2021

HỘI ĐỒNG BIÊN TẬP

Nguyễn Văn Hiệu - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
Nguyễn Việt Anh - Trường Đại học Xây dựng
Bùi Chí Bửu - Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Miền Nam
Vũ Dũng - Hội Tâm lý học Việt Nam
Trần Thọ Đạt - Trường Đại học Kinh tế Quốc dân
Nguyễn Đình Đức - Trường Đại học Công nghệ - Đại học Quốc gia Hà Nội
Vũ Minh Giang - Đại học Quốc gia Hà Nội
Trương Nam Hải - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
Từ Quang Hiến - Trường Đại học Nông lâm Thái Nguyên
Phạm Huy Khang - Trường Đại học Giao thông Vận tải
Phạm Gia Khánh - Chủ tịch Hội Ghép tạng Việt Nam
Hồ Đắc Lộc - Trường Đại học Kỹ thuật Công nghệ TP Hồ Chí Minh
Nguyễn Thị Mỹ Lộc - Trường Đại học Giáo dục - Đại học Quốc gia Hà Nội
Bành Tiến Long - Trường Đại học Bách khoa Hà Nội
Lê Quan Nghiệm - Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh
Mai Trọng Nhuận - Đại học Quốc gia Hà Nội
Nguyễn Thanh Phương - Trường Đại học Cần Thơ
Nguyễn Thanh Thủy - Trường Đại học Công nghệ - Đại học Quốc gia Hà Nội
Phạm Hùng Việt - Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia Hà Nội

TỔNG BIÊN TẬP

Đặng Ngọc Bảo

PHÓ TỔNG BIÊN TẬP

Nguyễn Thị Hải Hằng
Nguyễn Thị Hương Giang

TRƯỞNG BAN BIÊN TẬP

Phạm Thị Minh Nguyệt

TRƯỞNG BAN TRỊ SỰ

Lương Ngọc Quang Hưng

TRÌNH BÀY

Đinh Thị Luận

EDITORIAL COUNCIL

Nguyen Van Hieu - Vietnam Academy of Science and Technology
Nguyen Viet Anh - National University of Civil Engineering
Bui Chi Buu - Institute of Agricultural Science for Southern Vietnam
Vu Dung - Vietnam Association of Social Psychology
Tran Tho Dat - National Economics University
Nguyen Dinh Duc - University of Engineering and Technology - Vietnam National University, Hanoi
Vu Minh Giang - Vietnam National University, Hanoi
Truong Nam Hai - Vietnam Academy of Science and Technology
Tu Quang Hien - Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry
Pham Huy Khang - University of Transport and Communications
Pham Gia Khanh - President of Vietnam Society of Organ Transplantation
Ho Duc Loc - Ho Chi Minh City University of Technology
Nguyen Thi My Loc - University of Education, Vietnam National University, Hanoi
Banh Tien Long - Hanoi University of Science and Technology
Le Quan Nghiem - University of Medicine and Pharmacy of Ho Chi Minh City
Mai Trong Nhuan - Vietnam National University, Hanoi
Nguyen Thanh Phuong - Can Tho University
Nguyen Thanh Thuy - University of Engineering and Technology - Vietnam National University, Hanoi
Pham Hung Viet - VNU University of Science

EDITOR-IN-CHIEF

Dang Ngoc Bao

DEPUTY EDITORS

Nguyen Thi Hai Hang
Nguyen Thi Huong Giang

HEAD OF EDITORIAL BOARD

Pham Thi Minh Nguyet

HEAD OF ADMINISTRATION

Luong Ngoc Quang Hung

ART DIRECTOR

Dinh Thi Luan

TÒA SOẠN

113 Trần Duy Hưng - Cầu Giấy - Hà Nội
Tel: (84.24) 39436793; Fax: (84.24) 39436794
Email: khcnvn@most.gov.vn
Tạp chí điện tử: b.vjst.vn

EDITORIAL OFFICE

113 Tran Duy Hung Str. - Cau Giay Dist. - Hanoi
Tel: (84.24) 39436793; Fax: (84.24) 39436794
Email: khcnvn@most.gov.vn
E-journal: b.vjst.vn

GIẤY PHÉP XUẤT BẢN

Số 1153/GP-BTTTT ngày 26/7/2011
Số 2528/GP-BTTTT ngày 26/12/2012
Số 592/GP-BTTTT ngày 28/12/2016
Giá: 18000^d

PUBLICATION LICENCE

No.1153/GP-BTTTT 26th July 2011
No.2528/GP-BTTTT 26th December 2012
No.592/GP-BTTTT 28th December 2016

Mối liên quan giữa đa hình rs1801321 gen RAD51 và nguy cơ mắc ung thư buồng trứng

Lê Nguyễn Trọng Nhân^{1,2}, Nguyễn Thu Thúy², Nguyễn Quý Linh²,
Trần Văn Khánh^{2*}, Trần Huy Thịnh², Tạ Thành Văn², Nguyễn Việt Tiến²

¹Bệnh viện Sản Nhi Cà Mau

²Trường Đại học Y Hà Nội

Ngày nhận bài 5/11/2020; ngày chuyển phản biện 8/11/2020; ngày nhận phản biện 17/12/2020; ngày chấp nhận đăng 31/12/2020

Tóm tắt:

Ung thư buồng trứng là một trong những bệnh lý phụ khoa ác tính phổ biến. Gen RAD51 tham gia vào quá trình tái tổ hợp tương đồng, sửa chữa đứt gãy sợi đôi DNA, do đó những đa hình và đột biến của gen RAD51 có thể liên quan đến nguy cơ mắc ung thư. Bằng mô hình phân tích bệnh chứng, nhóm tác giả đã nghiên cứu xem liệu đa hình đơn nucleotide rs1801321 gen RAD51 có liên quan đến nguy cơ ung thư buồng trứng ở phụ nữ Việt Nam hay không. 380 bệnh nhân được chẩn đoán mắc ung thư buồng trứng và 380 người phụ nữ khỏe mạnh đã tham gia vào nghiên cứu. Các kiểu gen đa hình rs1801321 của các đối tượng nghiên cứu được xác định bằng kỹ thuật PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism). Tỷ lệ các kiểu gen GG, GT, TT được xác định lần lượt ở nhóm bệnh là 55,3; 29,2; 15,5% và ở nhóm đối chứng là 47,9; 41,8; 10,3%, có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai nhóm với $p=0,001$. Kết quả nghiên cứu cho thấy, đa hình đơn nucleotide rs1801321 gen RAD51 có liên quan đến nguy cơ mắc ung thư buồng trứng ở phụ nữ Việt Nam.

Từ khóa: đa hình đơn nucleotide, G172T, RAD51, rs1801321, ung thư buồng trứng.

Chỉ số phân loại: 3.1

Đặt vấn đề

Trong số các bệnh lý ác tính ở phụ nữ, ung thư buồng trứng có tỷ lệ mắc mới và tử vong cao trên toàn thế giới. Riêng ở Việt Nam, năm 2018, số ca ung thư buồng trứng là 1500, với 856 ca tử vong [1]. Nguyên nhân ung thư buồng trứng vẫn còn chưa rõ ràng và có nhiều yếu tố nguy cơ, trong đó yếu tố di truyền đã được chứng minh là đóng vai trò quan trọng trong quá trình hình thành ung thư buồng trứng.

Sự đứt gãy sợi đôi DNA (double strand breaks of DNA-DSBs) là tổn thương nguy hiểm nhất của DNA. Nếu không được sửa chữa, sự tích lũy của chúng làm mất ổn định hệ gen và dẫn đến phát triển nhiều bệnh ung thư khác nhau [2]. Gen RAD51 mã hóa protein RAD51 tham gia và đóng vai trò quan trọng trong quá trình sửa chữa tái tổ hợp tương đồng (Homologous recombination repair) nhằm phục hồi những tổn thương DNA [3, 4]. Các dữ liệu cho thấy, nồng độ RAD51 không tăng ở các tế bào bình thường. Raderschall và cs (2002) [5] chỉ ra rằng nồng độ RAD51 ở các tế bào ung thư tăng liên quan đến sự mất ổn định gen và quá trình tái tổ hợp tương đồng bất thường, có lẽ là dấu hiệu xuất hiện quá nhiều tổn thương DNA. Sự thay đổi trong tổng hợp RAD51 thường bắt đầu từ sự thay đổi trong phiên mã mRNA, và đa hình thái gen có thể ảnh hưởng sinh tổng hợp protein RAD51.

Đa hình đơn nucleotide (SNP) rs1801321 (G172T) nằm trong

vùng không mã hóa 5'-UTR trên gen RAD51 là vị trí điều hòa của vùng khởi động phiên mã, liên quan đến sự biểu hiện mRNA, do đó ảnh hưởng đến nồng độ và chức năng của protein RAD51 [6]. Nhiều nghiên cứu nhận định, SNP rs1801321 là một yếu tố nguy cơ đối với một số bệnh ung thư khác nhau như ung thư vú, ung thư nội mạc tử cung, ung thư đại trực tràng, ung thư biểu mô miệng, vòm họng và ung thư buồng trứng [7-12]. Tuy nhiên, các nghiên cứu về SNP này chủ yếu trên các cộng đồng người châu Âu và hiện nay chưa có nghiên cứu nào về vai trò của SNP rs1801321 đối với ung thư buồng trứng ở cộng đồng người Việt Nam. Nghiên cứu của chúng tôi nhằm mục tiêu xác định tỷ lệ đa hình đơn nucleotide rs1801321 gen RAD51 ở bệnh nhân ung thư buồng trứng và tìm hiểu mối liên quan của nó với nguy cơ mắc ung thư buồng trứng ở phụ nữ Việt Nam.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng

Nghiên cứu được thực hiện trên 380 bệnh nhân ung thư buồng trứng điều trị tại Bệnh viện Phụ sản Trung ương và 380 phụ nữ khỏe mạnh, không mắc ung thư.

Nhóm bệnh:

Tiêu chuẩn lựa chọn: được chẩn đoán xác định ung thư buồng trứng bằng kết quả xét nghiệm giải phẫu bệnh, không mắc các ung

* Tác giả liên hệ: Email: tranvankhanh@hmu.edu.vn

Association between RAD51 gene polymorphism rs1801321 and ovarian cancer risk

Nguyen Trong Nhan Le^{1,2}, Thu Thuy Nguyen²,
Quy Linh Nguyen², Van Khanh Tran^{2*},
Huy Thinh Tran², Thanh Van Ta², Viet Tien Nguyen²

¹Camau Obstetric Pediatric Hospital

²Hanoi Medical University

Received 5 November 2020; accepted 31 December 2020

Abstract:

Ovarian cancer is one of the most common gynecological malignancies. The gene RAD51 involves homologous recombination repair for double-strand breaks of DNA, so its polymorphisms and mutations are associated with cancer risk. The authors studied, by using a case-control design, whether single nucleotide polymorphism rs1801321 of RAD51 gene associated with ovarian cancer risk among Vietnamese females. Sample sets included 380 ovarian cancer cases and 380 healthy controls of similar age distribution. The genotypes of rs1801321 polymorphism were determined using the Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique. The distribution of genotype GG, GT, TT was 55.3, 29.2, 15.5% for the patients group and 47.9, 41.8, 10.3% for the control group, respectively ($p=0.001$). The RAD51 rs1801321 polymorphism was associated with the risk of ovarian cancer among Vietnamese females.

Keywords: G172T, ovarian cancer, polymorphism, RAD51 gene, rs1801321.

Classification number: 3.1

thư khác, và đồng ý tham gia nghiên cứu.

Tiêu chuẩn loại trừ: ung thư buồng trứng có kèm các ung thư khác, hoặc không đồng ý tham gia nghiên cứu.

Nhóm đối chứng: những người khỏe mạnh, có tiền sử không mắc ung thư buồng trứng hay các bệnh ung thư khác đến khám sức khỏe hoặc đến thăm khám điều trị các bệnh lành tính tại Bệnh viện Phụ sản Trung ương. Độ tuổi tương đồng với nhóm bệnh.

Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Thời gian nghiên cứu từ tháng 9/2017 đến tháng 12/2019 tại Trung tâm Nghiên cứu Gen-Protein, Trường Đại học Y Hà Nội.

Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu bệnh - chứng, có ước tính tỷ số nguy cơ OR với cỡ mẫu được tính theo công thức:

$$n = Z^2_{\alpha/2} \frac{\{1/[p_1(1-p_1)] + 1/[p_0(1-p_0)]\}}{[\ln(1-\epsilon)]^2}$$

trong đó: p_1 - tỷ lệ alen T ước lượng cho nhóm bệnh, p_0 - tỷ lệ alen T ước lượng cho nhóm chứng, α - mức ý nghĩa thống kê, $Z_{\alpha/2}$ - hệ số tin cậy, ϵ - mức độ chính xác mong muốn (chênh lệch cho phép giữa tỷ số nguy cơ OR thực của quần thể và OR thu được từ mẫu). Dựa vào nghiên cứu của Smolarz [12] với $p_1=0,529$ và $p_0=0,510$, $\epsilon=25\%$, $Z_{\alpha/2}=1,96$ khi $\alpha=0,05$ (độ tin cậy 95%), ta có $N=373$. Nên cỡ mẫu mỗi nhóm tối thiểu là 373 người. Nghiên cứu được tiến hành với 380 bệnh nhân và 380 phụ nữ thuộc nhóm chứng.

Quy trình

Bước 1 - Lấy mẫu: các đối tượng nghiên cứu được lấy 2 ml máu chống đông bằng EDTA.

Bước 2 - Tách chiết DNA: DNA tổng số được tách chiết từ mẫu máu theo kit PROMEGA (USA). Độ tinh sạch của mẫu DNA sau tách chiết của cả 2 nhóm được đo ở tỷ số A260/A280 đều nằm trong khoảng 1,80-2,00.

Bước 3 - Khuếch đại đoạn gen RAD51 chứa SNP rs1801321 bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu có trình tự như sau:

Mồi xuôi: 5'-TGGGAAGTCACTCATCTGG-3'

Mồi ngược: 5'-GCTCCGACTTCACCCCGCCGG-3'

Thành phần phản ứng PCR (thể tích 10 μ l) gồm: 5,0 μ l GoTaq Master mix, 2,5 pmol mỗi mồi xuôi và ngược, 100 ng DNA và H₂O. Chu trình nhiệt phản ứng: 94°C/5 phút, [94°C/30 giây, 56°C/30 giây, 72°C/30 giây] 35 chu kỳ, 72°C/5 phút. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1,5% ở điện thế 100 V trong 30 phút. Kết quả điện di được chụp ảnh bằng máy UVP EC3 Imaging System P/N95-0310-12.

Bước 4 - Xác định đa hình đơn nucleotide gen RAD51 bằng kỹ thuật phân tích đa hình độ dài cắt giới hạn (PCR-RFLP). Thành phần của phản ứng RFLP gồm: 0,5 μ l enzyme NgoMIV, 1 μ l buffer Cutsmart, 1,5 μ l H₂O và 7 μ l sản phẩm PCR. Hỗn hợp phản ứng cắt được ủ ở 37°C trong khoảng 12 giờ. Sản phẩm cắt được điện di trên gel agarose 3% với điện thế 80 V trong 60 phút để phân tách các băng DNA. Kết quả điện di được chụp ảnh bằng máy UVP EC3 Imaging System P/N95-0310-12.

Phân tích số liệu

Sự khác biệt về kiểu gen và tần số alen giữa nhóm bệnh và nhóm chứng cũng được đánh giá bằng kiểm định χ^2 . Tỷ số chênh (OR) và khoảng tin cậy (CI) 95% tương ứng để ước tính mối liên quan giữa các kiểu gen và khả năng mắc ung thư buồng trứng. Các kiểm định có ý nghĩa khi $p<0,05$. Phần mềm SPSS 20.0 được sử dụng để phân tích số liệu.

Đạo đức nghiên cứu

Đề tài đã được Hội đồng đạo đức của Trường Đại học Y Hà

Nội chấp thuận theo Chứng nhận số 107/HĐĐDDHYN ngày 30/5/2017. Bệnh nhân hoàn toàn tự nguyện tham gia nghiên cứu. Các thông tin cá nhân được bảo mật.

Kết quả

Đặc điểm chung của các đối tượng tham gia nghiên cứu

Những đặc điểm chung như tuổi trung bình, phân bố các nhóm tuổi và tình trạng kinh nguyệt ở cả hai nhóm được mô tả ở bảng 1. Độ tuổi và sự phân bố nhóm tuổi giữa nhóm bệnh và nhóm chứng là tương đồng ($p=0,610$ và $0,739$). Tuổi trung bình nhóm bệnh là 49,80 và tuổi trung bình nhóm chứng là 49,26. Ở những bệnh nhân ung thư buồng trứng, nhóm tuổi mắc bệnh nhiều nhất là từ 40 đến 59, chiếm 45,5% và ít nhất là nhóm tuổi <40 tuổi (chiếm 24,5%). Trung bình tuổi có kinh ở nhóm ung thư buồng trứng là 15,22, tương đồng với trung bình tuổi có kinh ở nhóm chứng là 15,01 ($p=0,096$). Tỷ lệ bệnh nhân mắc bệnh đã mãn kinh chiếm 56,3%, nhiều hơn so với những bệnh nhân chưa mãn kinh hoặc chưa có kinh chiếm 43,7% và tỷ lệ này không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai nhóm nghiên cứu ($p=0,423$).

Bảng 1. Đặc điểm chung của các đối tượng tham gia nghiên cứu.

Đặc điểm		Nhóm bệnh		Nhóm chứng	
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Tuổi	≤39	93	24,5	223	58,7
	40-59	173	45,5	128	33,7
	≥60	114	30,0	29	7,6
	Tuổi trung bình	49,8		49,26	
Tình trạng kinh nguyệt	Chưa mãn kinh/chưa có kinh	166	43,7	313	82,4
	Mãn kinh	214	56,3	67	17,6
Giải phẫu bệnh	UT biểu mô	308	81,1		
	UT tế bào mầm	44	11,6		
	UT tế bào đệm - sinh dục	28	7,4		
Giai đoạn bệnh	I	111	29,2		
	II	50	13,2		
	III	181	47,6		
	IV	38	10,0		

UT: ung thư.

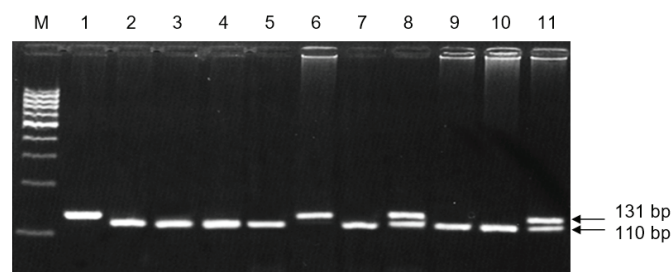
Ngoài ra, nhóm nghiên cứu còn phân tích sự phân bố tỷ lệ nhóm bệnh nhân được phân loại giai đoạn theo FIGO và mô bệnh học theo WHO (bảng 1). Kết quả phân loại theo giải phẫu bệnh cho thấy, ung thư biểu mô buồng trứng chiếm tỷ lệ cao nhất là 81,1%. Nhóm bệnh nhân được chẩn đoán ở giai đoạn tiến triển (III và IV-57,6%) chiếm tỷ lệ cao hơn so với nhóm bệnh nhân phát hiện bệnh sớm (I và II-42,4%).

Mối liên quan giữa đa hình rs1801321 và nguy cơ mắc ung thư buồng trứng

Trong trường hợp allele G, nhóm nghiên cứu sử dụng cặp mồi với trình tự mồi ngược có nucleotide ở vị trí thứ 3' đầu 3' là G (sai khác với nucleotide C trên trình tự DNA khuôn) để tạo thành trình tự nhận biết của enzyme NgoMVI ($G\downarrow CCGGC$) trong đoạn gen RAD51 chứa SNP rs1801321 được khuếch đại. Đoạn gen này sẽ bị

enzyme NgoMVI cắt thành 2 băng có kích thước 110 bp và 21 bp. Trong trường hợp allele T, đoạn gen được khuếch đại sẽ không có trình tự nhận biết của enzyme NgoMVI nên sẽ không bị cắt. Các kiểu gen sẽ có sản phẩm cắt tương ứng như sau:

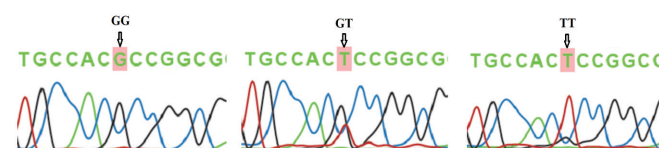
- Kiểu gen GG: sản phẩm cắt gồm các đoạn 110 bp, 21 bp.
- Kiểu gen TT: sản phẩm cắt gồm đoạn 131 bp.
- Kiểu gen GT: sản phẩm cắt gồm các đoạn 131 bp, 110 bp, 21 bp.



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm cắt của đoạn gen chứa SNP rs1801321 bởi enzyme NgoMVI. M: Marker 100 bp; sản phẩm PCR của đoạn gen chứa rs1801321 (1); kiểu gen GG (2-5, 7, 9, 10); kiểu gen TT (6); kiểu gen GT (8, 11).

Hình ảnh điện di trên gel agarose sản phẩm cắt đoạn gen chứa SNP rs1801321 bằng enzyme NgoMVI được thể hiện ở hình 1. Kết quả điện di sản phẩm của phản ứng cắt enzym cho thấy ở tất cả các mẫu băng thu được rõ nét, có kích thước khoảng 131 bp, 110 bp so trên thang DNA chuẩn tùy thuộc từng kiểu gen. Từ kết quả trên ta thấy enzym NgoMVI đã cắt sản phẩm PCR thành các đoạn DNA có kích thước đúng như tính toán lý thuyết của nghiên cứu.

Sản phẩm PCR-RFLP của các kiểu gen GG, GT, TT được kiểm tra lại bằng phương pháp giải trình tự gen và so sánh với trình tự chuẩn của gen RAD51 trên ngân hàng Genbank (NG_012120:c.-61G>T), tín hiệu giải trình tự của các kiểu gen với các đỉnh nucleotide rõ ràng, không nhiễu (hình 2). Mẫu PCR của kiểu gen TT có một đỉnh nucleotide T duy nhất, kiểu gen GT có hai đỉnh nucleotide G và nucleotide T, kiểu gen GG có một đỉnh nucleotide G duy nhất. Như vậy, kết quả giải trình tự thu được là trùng khớp với kết quả xác định kiểu gen bằng phương pháp PCR-RFLP.



Hình 2. Kết quả giải trình tự sản phẩm PCR đoạn gen RAD51 chứa đa hình đơn nucleotide rs1801321 của các bệnh nhân mang kiểu gen GG, GT, TT.

Alen T chiếm tỷ lệ thấp lần lượt ở nhóm bệnh là 30,1% và nhóm đối chứng là 31,2%. Tỷ lệ các kiểu gen GG, GT, TT lần lượt ở nhóm bệnh là 55,3, 29,2, 15,5% và ở nhóm đối chứng là 47,9, 41,8, 10,3%. Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê trong sự phân bố tỷ lệ alen giữa nhóm bệnh và nhóm đối chứng với

$p < 0,656$, tuy nhiên có khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các kiểu gen hai nhóm nghiên cứu với $p = 0,001$ (bảng 2).

Bảng 2. Mối liên quan giữa đa hình rs1801321 với nguy cơ ung thư buồng trứng.

Kiểu gen/allele	Nhóm bệnh		Nhóm chứng		OR	95%CI	p
	n	%	n	%			
Kiểu allele	G	531	69,9	523	68,8	1,000	0,656
	T	229	30,1	237	31,2	0,952	
Kiểu gen	GG	210	55,3	182	47,9	0,001	0,001
	GT	111	29,2	159	41,8		
	TT	59	15,5	39	10,3		
TT và GG	GG	210	78,1	182	82,4	1,000	0,238
	TT	59	21,9	39	17,6	1,311	
GG và GT	GG	210	65,4	182	53,4	1,000	0,002
	GT	111	34,6	159	46,6	0,605	
GT và TT	TT	59	34,7	39	19,7	1,000	0,001
	GT	111	65,3	159	80,3	0,461	
TT và GT+GG	GT+GG	321	84,5	341	89,7	1,000	0,030
	TT	59	15,5	39	10,3	1,607	
GG và TT+GT	GG	210	55,3	182	47,9	1,000	0,042
	TT+GT	170	44,7	198	52,1	0,744	

Nghiên cứu tiếp tục tiến hành so sánh khả năng mắc bệnh của các kiểu gen chứa alen T với các kiểu gen khác theo cặp mô hình di truyền khác. Đối với mô hình so sánh đồng hợp (TT với GG) cho kết quả không khác biệt về sự phân bố của hai kiểu gen giữa hai nhóm bệnh và chứng với $p = 0,238$, $OR = 1,311$ (CI 95% [0,836-2,057]). Trong khi hai mô hình so sánh dị hợp cho kết quả có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, với $p < 0,05$ và OR với khoảng tin cậy 95% không chứa giá trị 1, trong phân bố hai kiểu gen GG và GT giữa hai nhóm bệnh và chứng với $p = 0,002$, $OR = 0,605$ (CI 95% [0,442-0,828]), và trong phân bố hai kiểu gen TT và GT giữa hai nhóm bệnh và chứng với $p = 0,001$, $OR = 0,461$ (CI 95% [0,288-0,739]).

Khi so sánh mô hình di truyền lặn, nhóm kiểu gen TT với nhóm kết hợp kiểu gen GG và GT cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai nhóm nghiên cứu với $p = 0,030$, $OR = 1,607$ (CI 95% [1,043-2,476]). Và so sánh mô hình di truyền trội, nhóm kiểu gen chứa alen T (GT và TT) với nhóm kiểu gen GG, có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai nhóm nghiên cứu với $p = 0,042$, $OR = 0,744$ (CI 95% [0,559-0,990]).

Mối liên quan giữa đa hình rs1801321 với giai đoạn bệnh và mô bệnh học

So sánh sự phân bố kiểu gen trong các nhóm chia theo giai đoạn bệnh của FIGO không có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê ($p = 0,979$) (bảng 3). Tương tự, khi so sánh sự phân bố kiểu gen trong các nhóm chia theo type mô bệnh học (ung thư biểu mô, ung thư tế bào mầm và ung thư tế bào mô đệm - sinh dục) cũng không khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p = 0,701$) (bảng 3).

Bảng 3. Mối liên quan đa hình rs1801321 với giai đoạn bệnh và mô bệnh học.

	GG		GT		TT		p
	n	%	n	%	n	%	
Giai đoạn ung thư							
Giai đoạn I	62	29,5	31	27,9	18	30,5	0,979
Giai đoạn II	26	12,4	15	13,5	9	15,3	
Giai đoạn III	101	48,1	55	49,5	25	42,4	
Giai đoạn IV	21	10,0	10	9,0	7	11,9	
Mô bệnh học							
UT biểu mô	170	81,0	88	79,3	50	84,7	0,701
UT tế bào mầm	27	12,9	13	11,7	7	11,9	
UT mô đệm-sinh dục	13	6,2	10	9,0	2	3,4	

Bàn luận

Trong nghiên cứu này, độ tuổi hay gặp nhất của ung thư buồng trứng là 40-59. Nhóm tuổi ≥ 60 có tỷ lệ cao hơn nhóm tuổi ≤ 39 . Sự phân bố về nhóm tuổi này cũng tương đồng với kết quả của một số nghiên cứu khác tại Việt Nam [13]. Về tình trạng kinh nguyệt của nhóm bệnh nhân tham gia nghiên cứu, tỷ lệ bệnh nhân ung thư buồng trứng trong nhóm chưa mãn kinh hoặc chưa có kinh là 43,7%, thấp hơn nhóm đã mãn kinh (56,3%). Tương đồng với các nhận định của các tác giả khác là ung thư buồng trứng đa phần xuất hiện ở các bệnh nhân cao tuổi đã mãn kinh [14]. Kết quả giải phẫu bệnh ung thư biểu mô buồng trứng chiếm tỷ lệ cao nhất, và nhóm bệnh nhân được chẩn đoán ở giai đoạn tiến triển (III và IV) cao hơn nhóm bệnh nhân phát hiện bệnh sớm (I và II) là không khác biệt so với nhận định của các nghiên cứu trước đây [15].

Tỷ lệ alen T chiếm thấp hơn so với alen G ở trong cả hai nhóm nghiên cứu và sự phân bố tỷ lệ alen giữa hai nhóm không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Theo công bố Dữ liệu các biến thể di truyền người Việt Nam trên trang genomes.vn, nghiên cứu trên 206 người Kinh không có quan hệ huyết thống thì tỷ lệ alen T là 13,63% [16]. Tuy nhiên, tỷ lệ phân bố 3 kiểu gen giữa hai nhóm nghiên cứu lại có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p = 0,001$). Điều này cho thấy có mối liên quan giữa đa hình đơn nucleotide rs1801321 với nguy cơ mắc ung thư buồng trứng. Phân tích sâu hơn các dữ liệu để so sánh khả năng mắc bệnh của các kiểu gen chứa alen T và các kiểu gen còn lại, chúng tôi cũng ghi nhận được sự khác biệt có ý nghĩa thống kê trong hai nhóm nghiên cứu khi so sánh kiểu gen dị hợp GT với các kiểu gen đồng hợp GG và TT lần lượt với $OR = 0,605$, CI 95% [0,442-0,828] ($p = 0,002$) và $OR = 0,461$, CI 95% [0,288-0,739] ($p = 0,001$). Nghiên cứu cho thấy kiểu gen dị hợp GT lại mang nguy cơ mắc ung thư buồng trứng thấp hơn hai kiểu gen đồng hợp là GG và TT.

Khi so sánh nhóm hai kiểu gen GG và GT với nhóm kiểu gen TT, với $OR = 1,607$ (CI 95% [1,043-2,476]) ($p = 0,030$) và so sánh nhóm kiểu gen GG với nhóm hai kiểu gen TT và GT, với $OR = 0,744$ (CI 95% [0,559-0,990]) ($p = 0,042$) cho thấy nhóm các cặp gen chứa kiểu gen GT đều có nguy cơ mắc ung thư buồng trứng thấp hơn kiểu gen còn lại.

Nhiều nghiên cứu khác trên thế giới được thực hiện và đã công bố nhằm mục đích làm sáng tỏ vai trò của đa hình rs1801321 gen RAD51 trong nguy cơ ung thư buồng trứng, nhưng kết quả còn gây tranh cãi, phụ thuộc vào thiết kế, phương pháp nghiên cứu, và quần

thể người được nghiên cứu. Trong nghiên cứu của Smolarz và cs (2013) [12] trên phụ nữ Ba Lan với 210 bệnh nhân ung thư buồng trứng và 210 đối chứng, mẫu nghiên cứu là mô buồng trứng (có và không có tế bào ung thư), kết quả cho thấy không có sự khác biệt trong phân bố các alen ($p=0,631$) cũng như kiểu gen ($p=0,689$) giữa hai nhóm nghiên cứu, họ nhận định SNP rs1801321 gen RAD51 không liên quan đến nguy cơ ung thư buồng trứng ở phụ nữ Ba Lan. Nghiên cứu của Auranen và cs (2005) [17] phân tích tổng hợp 4 nghiên cứu lớn trên 1644 bệnh nhân ung thư buồng trứng và 2602 đối chứng cho kết quả alen T chiếm tỷ lệ 42% ở cả nhóm bệnh và nhóm chứng, và không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê trong sự phân bố các kiểu gen ở hai nhóm nghiên cứu ($p=0,39$). Nghiên cứu này chưa tìm thấy mối liên quan giữa đa hình 1801321 với nguy cơ mắc ung thư buồng trứng. Quay và cs (2009) [18] tổng hợp từ 3 nghiên cứu bệnh chứng lớn ở Anh, Mỹ và Đan Mạch với cỡ mẫu gồm 1412 bệnh nhân ung thư buồng trứng và 1986 đối chứng đã kết luận rằng, không có mối liên quan giữa đa hình rs1801321 gen RAD51 với nguy cơ mắc ung thư buồng trứng ($p=0,053$). Nghiên cứu của Wang và cs (2001) [19] trên những người mang đột biến BRCA1/2 cũng chỉ ra SNP 172G>T gen RAD51 không liên quan đến nguy cơ mắc ung thư buồng trứng.

Ngoài ra, mối liên quan giữa rs1801321 với một số bệnh ung thư khác cũng được nghiên cứu và thu được những kết quả khác nhau. Nghiên cứu của Tulbah và cs (2016) [7] cho thấy đa hình 172G>T của gen RAD51 có liên quan đến nguy cơ mắc ung thư vú ở phụ nữ Ả Rập, alen T có ảnh hưởng bảo vệ khỏi nguy cơ mắc ung thư vú cao với $OR=0,126$ ($CI\ 95\%=0,080-0,199$), $p<0,001$. Kết quả nghiên cứu của nhóm Romanowicz-Makowska và cs (2012) [9] chỉ ra rằng không có mối liên quan giữa rs1801321 với ung thư đại trực tràng ở bệnh nhân người Ba Lan. Tuy nhiên, một nghiên cứu của Petrovic-Sunderic và cs (2018) [10] lại chứng minh được mối liên quan có ý nghĩa giữa rs1801321 với ung thư đại trực tràng ở người Serbia. Santos và cs (2019) [11] đã chứng minh rs1801321 kết hợp với các chất gây ung thư từ môi trường (rượu, thuốc lá) có liên quan đến sự tiến triển của ung thư biểu mô miệng và vòm họng. Một nghiên cứu của Michalska và cs (2014) [8] cũng trên cộng đồng phụ nữ Ba Lan với 630 bệnh nhân ung thư nội mạc tử cung và 630 đối chứng cũng cho kết luận rs1801321 gen RAD51 không liên quan với nguy cơ ung thư nội mạc tử cung vì không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê trong sự phân bố các alen ($p=0,359$) và các kiểu gen ($p=0,392$) giữa các nhóm nghiên cứu.

Phân tích vai trò các alen và kiểu gen đa hình đơn nucleotide rs1801321 đối với giai đoạn bệnh theo FIGO và type mô bệnh học ung thư buồng trứng nhận thấy, không có sự liên quan giữa đa hình đơn nucleotide rs1801321 với giai đoạn bệnh và type mô bệnh học của ung thư buồng trứng. Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của Smolarz và cs (2013) [12].

Kết luận

Trong nghiên cứu của chúng tôi hiện tại tìm thấy mối liên quan giữa đa hình đơn nucleotide rs1801321 gen RAD51 và nguy cơ mắc ung thư buồng trứng ở người Việt Nam, cụ thể kiểu gen GT có khả năng làm giảm nguy cơ mắc ung thư buồng trứng. Kết quả xét nghiệm đa hình đơn nucleotide rs1801321 gen RAD51 góp phần vào đánh giá khả năng mắc ung thư buồng trứng ở phụ nữ Việt Nam. Từ đó

có những biện pháp tầm soát, dự phòng hợp lý nhằm chẩn đoán, phát hiện kịp thời ung thư buồng trứng ở giai đoạn sớm để điều trị hiệu quả và ít tổn kém hơn. Ngoài đa hình rs1801321 gen RAD51 còn nhiều yếu tố nguy cơ di truyền và không di truyền ảnh hưởng đến nguy cơ mắc ung thư buồng trứng. Kết quả này đóng góp vào cơ sở dữ liệu cho những nghiên cứu phân tích lớn hơn và đa yếu tố để đánh giá chính xác hơn nguy cơ mắc ung thư buồng trứng.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của Bộ Y tế thông qua đề tài: “Nghiên cứu xây dựng quy trình xác định đột biến và đa hình thái đơn nucleotide trên một số gen liên quan đến ung thư vú và ung thư buồng trứng”. Nhóm nghiên cứu trân trọng cảm ơn Bệnh viện Phụ sản Trung ương, Trung tâm Nghiên cứu Gen-Protein, Trường Đại học Y Hà Nội.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] F. Bray, et al. (2018), “Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries”, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **68**(6), pp.394-424.
- [2] S.P. Jackson (2002), “Sensing and repairing DNA double-strand breaks”, *Carcinogenesis*, **23**(5), pp.687-696.
- [3] T. Helleday (2003), “Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells”, *Mutation Research*, **532**(1-2), pp.103-115.
- [4] J. Thacker (2005), “The RAD51 gene family, genetic instability and cancer”, *Cancer Letters*, **219**(2), pp.125-135.
- [5] E. Raderschall, et al. (2002), “Elevated levels of Rad51 recombination protein in tumor cells”, *Cancer Research*, **62**(1), pp.219-225.
- [6] L. Hasselbach, et al. (2005), “Characterisation of the promoter region of the human DNA-repair gene Rad51”, *European Journal Gynaecological Oncology*, **26**(6), pp.589-598.
- [7] S. Tulbah, et al. (2016), “Polymorphisms in RAD51 and their relation with breast cancer in Saudi females”, *Onco Targets and Therapy*, **9**, pp.269-277.
- [8] M.M. Michalska, et al. (2014), “Association of polymorphisms in the 5' untranslated region of RAD51 gene with risk of endometrial cancer in the Polish population”, *Archives of Gynecology Obstetrics*, **290**(5), pp.985-991.
- [9] H. Romanowicz-Makowska, et al. (2012), “RAD51 gene polymorphisms and sporadic colorectal cancer risk in Poland”, *Polish Journal of Pathology*, **63**(3), pp.193-198.
- [10] J. Petrovic-Sunderic, et al. (2018), “Polymorphism RAD51 172G>T in Serbian patients with colorectal cancer”, *Journal of B.U.ON.*, **23**(4), pp.936-940.
- [11] E.M. Santos, et al. (2019), “Clinicopathological significance of SNPs in RAD51 and XRCC3 in oral and oropharyngeal carcinomas”, *Oral Diseases*, **25**(1), pp.54-63.
- [12] B. Smolarz, et al. (2013), “Association between polymorphisms of the DNA repair gene RAD51 and ovarian cancer”, *Polish Journal of Pathology*, **64**(4), pp.290-295.
- [13] Phạm Thị Diệu Hà, Nguyễn Văn Tuyên (2013), “Nhận xét giá trị HE4 và test ROMA trong chẩn đoán ung thư buồng trứng”, *Tạp chí Nghiên cứu Y học*, **82**(2), tr.37-44.
- [14] D. Jelovac, and D.K. Armstrong (2011), “Recent progress in the diagnosis and treatment of ovarian cancer”, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **61**(3), pp.183-203.
- [15] Vũ Hồ, Vi Trần Doanh, Lê Thị Lộc và cộng sự (2010), “Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng - mô bệnh học và điều trị ung thư buồng trứng tại Trung tâm Ung bướu Thái Nguyên từ 2005 - T8/2010”, *Tạp chí Y học TP Hồ Chí Minh*, **14**(4), tr.491 -494.
- [16] V.S. Le, et al. (2019), “A Vietnamese human genetic variation database”, *Human Mutation*, **40**(10), pp.1664-1675.
- [17] A. Auranen, et al. (2005), “Polymorphisms in DNA repair genes and epithelial ovarian cancer risk”, *International Journal of Cancer*, **117**(4), pp.611-618.
- [18] L. Quay, et al. (2009), “Association between common germline genetic variation in 94 candidate genes or regions and risks of invasive epithelial ovarian cancer”, *PLoS One*, **4**(6), p.e5983.
- [19] W.W. Wang, et al. (2001), “A single nucleotide polymorphism in the 5' untranslated region of RAD51 and risk of cancer among BRCA1/2 mutation carriers”, *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, **10**(9), pp.955-960.

Đánh giá chỉ số độ sâu tiền phòng và chiều dài trục nhãn cầu trên mắt cận thị cao

Nguyễn Thị Thu Hiền*, Phạm Thị Minh Châu

Bệnh viện Mắt Trung ương

Ngày nhận bài 19/3/2021; ngày chuyển phản biện 25/3/2021; ngày nhận phản biện 26/4/2021; ngày chấp nhận đăng 29/4/2021

Tóm tắt:

Mục tiêu: đánh giá chỉ số độ sâu tiền phòng, chiều dài trục nhãn cầu và tìm hiểu mối liên quan giữa các chỉ số này trên mắt cận thị cao. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** nghiên cứu mô tả, được thực hiện trên 168 mắt (88 bệnh nhân, từ 12 tuổi trở lên) được chẩn đoán là cận thị cao (trên -6D). **Kết quả:** độ cận trung bình là $-8,75 \pm 2,61$ D. Độ sâu tiền phòng trung bình là $3,72 \pm 0,20$ mm. Trục nhãn cầu trung bình là $27,33 \pm 1,49$ mm. Độ sâu tiền phòng và mức độ cận thị cao không có tương quan tuyến tính với nhau ($r=0,044$ và $p>0,05$). Chiều dài trục nhãn cầu và mức độ cận thị cao có mối tương quan chặt chẽ với nhau ($r=-0,762$ và $p<0,001$). Hai chỉ số độ sâu tiền phòng và trục nhãn cầu có mối tương quan tuyến tính đồng biến rất yếu ($r=0,165$ và $p<0,05$). **Kết luận:** mức độ cận thị không liên quan đến độ sâu tiền phòng nhưng liên quan chặt chẽ với chiều dài trục nhãn cầu. Chiều dài trục nhãn cầu trên bệnh nhân cận thị cao là một chỉ số quan trọng giúp cho chẩn đoán, tiên lượng và điều trị.

Từ khóa: cận thị cao, chiều dài trục nhãn cầu, độ sâu tiền phòng.

Chỉ số phân loại: 3.2

Đặt vấn đề

Tật khúc xạ là một trong những nguyên nhân chính gây giảm thị lực ở nhiều nước trên thế giới cũng như ở Việt Nam. Cận thị là loại tật khúc xạ hay gặp nhất, chiếm khoảng 25% tổng dân số thế giới. Theo báo cáo của Tổ chức Y tế thế giới (WHO) cũng như nhiều nghiên cứu đưa ra, tại thời điểm 2010, tỷ lệ cận thị chiếm khoảng 28% dân số thế giới, tương ứng với 1,9 tỷ người, trong đó cận thị cao chiếm 3%, tương ứng với 205 triệu người. Dự đoán đến năm 2050, tỷ lệ cận thị sẽ tăng lên đến 52% dân số thế giới (khoảng 5 tỷ người), trong đó cận thị cao chiếm 10% (khoảng 911 triệu người) [1, 2]. Đây sẽ là một gánh nặng rất lớn khi tỷ lệ cận thị và cận thị cao chủ yếu nằm ở nhóm thanh thiếu niên, tầng lớp lao động chính, đặc biệt là ở các nước Đông Nam Á, trong đó có Việt Nam.

Hiện nay, có rất nhiều phương pháp điều trị cận thị: đeo kính (kính gọng, kính tiếp xúc, ortho-K...) và phẫu thuật (phẫu thuật trên bề mặt giác mạc và phẫu thuật nội nhãn). Đặc biệt, ở lứa tuổi thanh niên khi độ cận thị đã ổn định, có thể lựa chọn phương pháp phẫu thuật để giảm hoặc triệt tiêu độ cận thị. Với những mắt cận thị cao, để lựa chọn được phương pháp phẫu thuật tối ưu nhất cho từng đối tượng, bác sĩ nhãn khoa sẽ phải cân nhắc các yếu tố: tuổi, mức độ cận thị, một số chỉ số của mắt như độ dày giác mạc, khúc xạ giác mạc, chiều dài trục nhãn cầu, độ sâu tiền phòng... và nhu

cầu của người bệnh để có thể tư vấn cho bệnh nhân phẫu thuật laser trên bề mặt giác mạc hay phẫu thuật đặt kính nội nhãn. Những bệnh nhân cận thị cao nếu độ dày giác mạc không cho phép sẽ không phẫu thuật được bằng phương pháp laser trên bề mặt giác mạc, nhưng có phẫu thuật bằng phương pháp đặt kính nội nhãn được hay không lại phụ thuộc vào độ sâu tiền phòng có đủ sâu hay không. Ngoài ra, với những mắt cận thị cao càng cần được chú ý do nguy cơ biến chứng trên nhóm đối tượng này. Để đo được các chỉ số nêu trên, hiện nay với sự phát triển của công nghệ, với phương pháp đo quang học không tiếp xúc trực tiếp trên nhãn cầu, máy IOL Master giúp các bác sĩ nhãn khoa có thể đo nhanh chóng và an toàn một số chỉ số sinh trắc nhãn cầu.

Theo nghiên cứu của các tác giả trong và ngoài nước [3, 4], các chỉ số sinh học của mắt như chiều dài trục nhãn cầu, độ sâu tiền phòng, đều có mối liên hệ với tình trạng cận thị. Để tìm hiểu về các chỉ số này và mối liên quan với mức độ cận thị trên mắt cận thị cao, giúp cho các phẫu thuật viên khúc xạ có thể chỉ định phương pháp phẫu thuật thích hợp cho bệnh nhân, đồng thời tiên lượng được kết quả của phẫu thuật, nhóm tác giả tiến hành nghiên cứu đề tài này nhằm mục tiêu: 1) Đánh giá các chỉ số: độ sâu tiền phòng và chiều dài trục nhãn cầu trên mắt cận thị cao; 2) Tìm hiểu mối liên quan giữa các chỉ số: độ sâu tiền phòng và chiều dài trục nhãn cầu trên mắt cận thị cao.

* Tác giả liên hệ: Email: thuhienvnio@gmail.com

Evaluating the anterior chamber depth and axis length in high myopia

Thi Thu Hien Nguyen*, Thi Minh Chau Pham

Vietnam National Institute of Ophthalmology

Received 19 March 2021; accepted 29 April 2021

Abstract:

Objectives: to evaluate the anterior chamber depth (ACD), axis length (AL), and the relationships between ACD and AL in high myopia patients. **Objects and methods:** a descriptive study was conducted on 168 eyes (88 patients, ≥ 12 years old) diagnosed with high myopia (more than $-6D$). **Results:** the average myopia degree, ACD, and AL were $-8.75 \pm 2.61D$, 3.72 ± 0.20 mm, and 27.33 ± 1.49 mm, respectively. There was no statistical signification between ACD and myopia degree ($r=0.044$; $p>0.05$), strong correlation between AL and myopia degree ($r=-0.762$; $p<0.001$), and weak correlation between ACD and AL ($r=0.165$; $p<0.05$). **Conclusion:** myopia degree does not relate to ACD, but has a strong correlation to AL. Measuring the AL on high myopia patients is important for the diagnosis, prognosis, and treatment.

Keywords: anterior chamber depth (ACD), axis length (AL), high myopia.

Classification number: 3.2

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại Khoa Khúc xạ - Bệnh viện Mắt Trung ương trên đối tượng nghiên cứu với các tiêu chuẩn sau:

Tiêu chuẩn lựa chọn: bệnh nhân từ 12 tuổi trở lên, có 1 hoặc cả 2 mắt được chẩn đoán cận thị từ $-6D$ trở lên (sau soi bóng đồng tử có tra thuốc liệt điều tiết), có hoặc không kèm loạn thị, gia đình và người bệnh đồng ý tham gia nghiên cứu.

Tiêu chuẩn loại trừ: bệnh nhân có các tổn thương thực thể tại mắt: sẹo giác mạc, bong võng mạc, lác, sụp mi...

Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu: nghiên cứu mô tả.

Nghiên cứu được thực hiện trên 168 mắt của 88 bệnh nhân đến khám tại Khoa Khúc xạ - Bệnh viện Mắt Trung ương từ tháng 1-9/2020.

Phương tiện nghiên cứu: máy chiếu thị lực, hộp thử kính, máy đo khúc xạ tự động, máy soi bóng đồng tử, máy soi đáy mắt, máy Zeiss IOL Master700, thuốc Cyclogyl 1%, bệnh án nghiên cứu.

Các bước tiến hành nghiên cứu:

- Điều tra thông tin: tuổi, giới tính, thời gian phát hiện cận thị.
- Đo khúc xạ bằng soi bóng đồng tử sau tra thuốc Cyclogyl 1%.
- Đo khúc xạ chủ quan cầu tối ưu và trụ Jackson.
- Khám mắt và soi đáy mắt.
- Đo chiều sâu tiền phòng, đo chiều dài trục nhãn cầu bằng máy IOL Master700.
- Xử lý số liệu: số liệu được thu thập và xử lý bằng phần mềm SPSS 20.0.

Kết quả và bàn luận

Đặc điểm bệnh nhân

Đặc điểm chung: nghiên cứu thực hiện trên 88 bệnh nhân, gồm 168 mắt cận thị cao, trong khoảng 12-47 tuổi, độ tuổi trung bình là $20,35 \pm 7,19$.

Tổng số mắt nghiên cứu là 168 mắt, trong đó, số mắt của bệnh nhân nam là 61 mắt, tương ứng với 36,3%; số mắt của bệnh nhân nữ là 107 mắt, tương ứng với 63,7%.

Tình hình cận thị: nhóm nghiên cứu được chia thành 7 nhóm (bảng 1), trong đó nhóm có độ cận $-7,75$ đến $-6D$ và nhóm $-9,75$ đến $-8D$ chiếm tỷ lệ nhiều nhất (81%). Công

suất cận thị trung bình là $-8,75 \pm 2,61D$, trong đó công suất cận thị thấp nhất là $-6D$; cao nhất là $-19,75D$.

Bảng 1. Phân nhóm cận thị cao theo công suất cận thị.

Nhóm	Số lượng	Tỷ lệ (%)
-7,75 đến -6D	68	40,5
-9,75 đến -8D	68	40,5
-11,75 đến -10D	16	9,5
-13,75 đến -12D	6	3,6
-15,75 đến -12D	2	1,2
-17,75 đến -16D	5	3,0
-19,75 đến -18D	3	1,7
Tổng	168	100

Thời gian phát hiện cận thị: thời gian phát hiện cận thị trung bình là $11,21 \pm 6,01$ năm, trong đó, thời gian phát hiện cận thị ngắn nhất là 1 năm, dài nhất là 34 năm.

Đánh giá chỉ số độ sâu tiền phòng và chiều dài trục nhãn cầu

Độ sâu tiền phòng: độ sâu tiền phòng trung bình là $3,72 \pm 0,20$ mm, mắt có độ sâu tiền phòng nông nhất là 3,24 mm, mắt có độ sâu tiền phòng sâu nhất là 4,20 mm.

Độ sâu tiền phòng trung bình trong nghiên cứu này lớn hơn so với độ sâu tiền phòng trung bình của mắt chính thị trong nghiên cứu của Nguyễn Thị Tuyết năm 2002 [5] ($2,69 \pm 0,02$ mm) đo bằng phương pháp siêu âm và lớn hơn độ sâu tiền phòng của nhóm cận thị trung bình trong nghiên cứu của Nguyễn Thị Thanh Dung năm 2017 [3] ($3,29 \pm 0,22$ mm) đo bằng IOL Master. Điều này cho thấy độ sâu tiền phòng của mắt cận thị cao lớn hơn so với mắt cận thị trung bình và lớn hơn hẳn so với mắt bình thường. Kết quả nghiên cứu cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của S-Y. Lin và cộng sự năm 1998 [6]. Phương pháp đo độ sâu tiền phòng có thể ảnh hưởng đến kết quả đo, nếu đo bằng phương pháp siêu âm thì độ sâu tiền phòng được tính từ trung tâm mắt trước giác mạc đến mặt trước thể thủy tinh, nếu đo bằng phương pháp IOL Master thì độ sâu tiền phòng được tính từ trung tâm mắt sau giác mạc đến mặt trước thể thủy tinh, chênh lệch với kết quả của siêu âm bằng độ dày của giác mạc trung tâm.

Chiều dài trục nhãn cầu: chiều dài trục nhãn cầu trung bình là $27,33 \pm 1,49$ mm. Mắt có trục ngắn nhất là 24,23 mm và dài nhất là 32,83 mm.

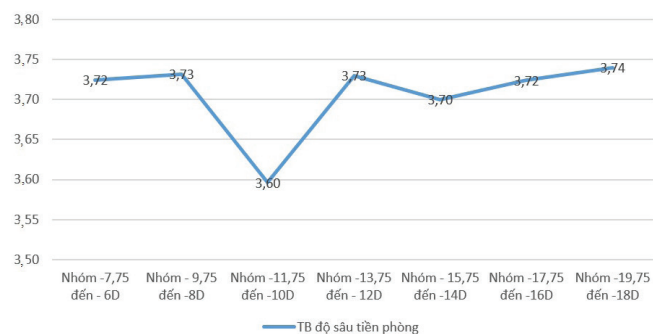
Chiều dài trục nhãn cầu trung bình trong nghiên cứu này lớn hơn so với chiều dài trục nhãn cầu trung bình của mắt chính thị trong nghiên cứu của Hoàng Hồ năm 1996 [7] trên 261 mắt người trưởng thành (nữ giới là $22,77 \pm 0,06$ mm và ở nam giới là $23,5 \pm 0,10$ mm) đo bằng phương pháp siêu âm và lớn hơn chiều dài trục nhãn cầu của nhóm cận thị trung bình trong nghiên cứu của Nguyễn Thị Thanh Dung

năm 2017 [3] ($25,63 \pm 0,78$ mm) đo bằng IOL Master. Điều này cho thấy chiều dài trục nhãn cầu của mắt cận thị cao dài hơn so với mắt cận thị trung bình và dài hơn hẳn so với mắt bình thường. Ngoài tác động làm kéo dài trục nhãn cầu, cận thị cao có thể kèm theo dẫn lỗi củng mạc phía sau, gây ảnh hưởng đến thị lực của bệnh nhân, ngoài ra trục nhãn cầu càng kéo dài thì liên kết giữa các lớp vỏ nhãn cầu (củng mạc, hắc mạc và võng mạc) càng trở nên lỏng lẻo, làm tăng nguy cơ biến chứng thoái hóa của võng mạc.

Liên quan giữa các chỉ số sinh học và mức độ cận thị cao

Tương quan giữa độ sâu tiền phòng và mức độ cận thị cao: hai chỉ số độ sâu tiền phòng và mức độ cận thị cao không có tương quan tuyến tính với nhau ($r=0,044$ và $p>0,05$).

Giá trị trung bình độ sâu tiền phòng theo mức độ cận thị được thể hiện trên đồ thị 1.



Đồ thị 1. Độ sâu tiền phòng theo mức độ cận thị.

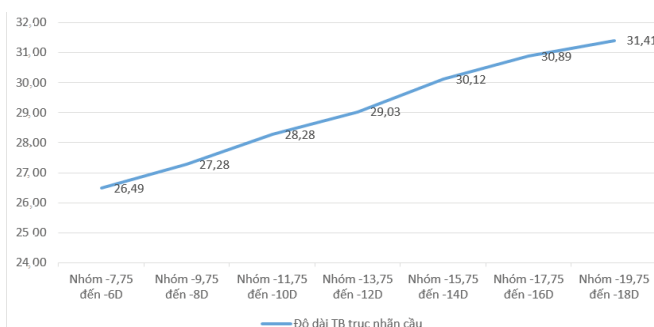
Theo đồ thị 1, độ sâu tiền phòng trung bình thay đổi rất ít ở tất cả các mức độ cận thị ($p>0,05$), có nghĩa là với cận thị cao, độ sâu tiền phòng không bị tác động bởi sự tăng công suất cận thị.

Một số nghiên cứu của các tác giả khác lại cho kết quả trái ngược, như Đường Thị Anh Thơ (2008) [8], M.J. Chen và cộng sự (2009) [4], M. Hosny và cộng sự (2000) [9]. Những nghiên cứu trên cho rằng, có một mối tương quan nghịch biến giữa độ sâu tiền phòng và mức độ cận thị. Như vậy, có thể thấy rằng không thống nhất giữa kết quả nghiên cứu của các tác giả. Chỉ số độ sâu tiền phòng trên mắt cận thị cao rất quan trọng cho việc quyết định có phẫu thuật được bằng phương pháp Phakic ICL để bỏ kính đeo cho bệnh nhân hay không, tuy nhiên với kết quả nghiên cứu này thì muốn biết độ sâu tiền phòng của mắt cận thị cao, không thể dự đoán dựa vào công suất cận thị.

Tương quan giữa chiều dài trục nhãn cầu và mức độ cận thị cao: hai chỉ số chiều dài trục nhãn cầu và mức độ cận thị cao có mối tương quan nghịch biến chặt chẽ với hệ số tương quan $r=-0,762$ và $p<0,001$. Trục nhãn cầu càng dài

thị độ cận càng cao, mối tương quan giữa 2 chỉ số này rất chặt chẽ với phương trình tương quan: $y = -0,433 \cdot x + 23,538$ (x là chiều dài trục nhãn cầu, y là giá trị tuyệt đối cầu tương đương)

Giá trị trung bình của chiều dài trục nhãn cầu theo mức độ cận thị được thể hiện trên đồ thị 2.



Đồ thị 2. Chiều dài trục nhãn cầu theo mức độ cận thị.

Chiều dài trục nhãn cầu trung bình tăng dần theo mức độ tăng của công suất cận thị ($p < 0,001$). Ở nhóm cận thị -7,75 đến -6D chiều dài trục nhãn cầu trung bình là 26,49 mm và trục nhãn cầu dài nhất 31,41 mm ở nhóm cận thị -19,75 đến -18D. Kết quả này cũng phù hợp với những nghiên cứu trước đây của các tác giả khác như Đường Thị Anh Thơ (2008) [8], M.-J. Chen và cộng sự (2009) [4]. Tất cả các nghiên cứu trên đều cho thấy mức độ cận càng cao chiều dài trục nhãn cầu càng dài.

Dựa trên kết quả nghiên cứu này, nếu biết được công suất cận thị trên mắt cận thị cao có thể dự đoán được chiều dài trục nhãn cầu, giúp các bác sỹ nhãn khoa tiên lượng được các nguy cơ biến chứng đáy mắt có thể xảy ra với bệnh nhân để có những tư vấn phù hợp.

Tương quan giữa độ sâu tiền phòng và chiều dài trục nhãn cầu trên mắt cận thị cao: giữa độ sâu tiền phòng và chiều dài trục nhãn cầu có mối tương quan tuyến tính đồng biến yếu với hệ số tương quan $r = 0,165$ và $p < 0,05$.

Bảng 2. Tương quan giữa chiều dài trục nhãn cầu và độ sâu tiền phòng theo nhóm cận thị.

Mối tương quan giữa các chỉ số	Công suất $\leq -8D$	Công suất $\geq -8D$
Trục nhãn cầu và độ sâu tiền phòng	$r = 0,358$ $p = 0,001$	$r = 0,138$ $p = 0,172$

Khi tìm hiểu mối liên quan giữa chiều dài trục nhãn cầu và độ sâu tiền phòng ở từng nhóm mức độ cận thị, các tác giả thấy rằng: ở nhóm công suất cận thị dưới -8D có mối tương quan tuyến tính đồng biến giữa chiều dài trục nhãn cầu và độ sâu tiền phòng với $r = 0,358$ và $p = 0,001$, nhưng ở nhóm công suất cận thị từ -8D trở lên không tìm thấy

mối tương quan giữa chiều dài trục nhãn cầu và độ sâu tiền phòng ($p > 0,05$) (bảng 2). Như vậy với công suất cận thị -8D, ở những mắt cận thị cao trục nhãn cầu kéo dài ra sẽ kèm theo độ sâu tiền phòng cũng sâu hơn, nhưng nếu mắt cận thị cao có công suất cận thị trên -8D trục nhãn cầu có kéo dài thêm cũng không làm cho tiền phòng sâu hơn.

Kết luận

Nghiên cứu mô tả được thực hiện ở 168 mắt (88 bệnh nhân, từ 12 tuổi trở lên), được chẩn đoán là cận thị cao (trên -6D), kết quả cho thấy:

- Độ sâu tiền phòng trung bình là $3,72 \pm 0,20$ mm. Chiều dài trục nhãn cầu trung bình là $27,33 \pm 1,49$ mm.

- Không có mối tương quan giữa độ sâu tiền phòng với mức độ cận trên mắt cận thị cao (với $r = 0,044$ và $p > 0,05$). Chiều dài trục nhãn cầu có mối tương quan chặt chẽ với mức độ cận trên mắt cận thị cao ($r = -0,762$ và $p < 0,001$). Chiều dài trục nhãn cầu và độ sâu tiền phòng có mối tương quan tuyến tính đồng biến yếu ($r = 0,165$ và $p < 0,05$).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S-M. Saw, S. Matsumura, Q.V. Hoang (2019), "Prevention and management of myopia and myopic pathology", *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **60**(2), pp.488-499.
- [2] B.A. Holden, et al. (2016), "Global prevalence of myopia and high myopia and temporal trends from 2000 through 2050", *Ophthalmology*, **123**(5), pp.1036-1042.
- [3] Nguyễn Thị Thanh Dung (2017), *Đánh giá các chỉ số: trục nhãn cầu, độ dày giác mạc, khúc xạ giác mạc và độ sâu tiền phòng trên mắt cận thị ở lứa tuổi thanh niên*, Luận văn Thạc sỹ y học, Trường Đại học Y Hà Nội.
- [4] M.-J. Chen, et al. (2009), "Relationship between central corneal thickness, refractive error, corneal curvature, anterior chamber depth and axial length", *J. Chin. Med. Assoc.*, **72**(3), pp.133-137.
- [5] Nguyễn Thị Tuyết (2002), *Nghiên cứu sự tương quan giữa độ sâu tiền phòng, bề dày thể thủy tinh, chiều dài trục nhãn cầu trên mắt glôcôm góc đóng nguyên phát và mắt bình thường ở người Việt Nam trưởng thành*, Luận văn Thạc sỹ y học, Trường Đại học Y Hà Nội.
- [6] S-Y. Lin, et al. (1998), "Changes of anterior segment in myopic eyes: analysis with Scheimpflug system", *Myopia Updates*, pp.106-107.
- [7] Hoàng Hồ (1996), *Siêu âm chẩn đoán nhãn khoa*, Bệnh viện Mắt Trung ương.
- [8] Đường Thị Anh Thơ (2008), *Khảo sát một số chỉ số sinh học mắt trẻ em có tật khúc xạ*, Luận văn Thạc sỹ y học, Trường Đại học Y Hà Nội.
- [9] M. Hosny, et al. (2000), "Relationship between anterior chamber depth, refractive state, corneal diameter, and axial length", *J. Refract. Surg.*, **16**(3), pp.336-340.

Xây dựng quy trình phân tích kiểm tra chất lượng dược chất phóng xạ ^{18}F -Choline

Vũ Thanh Quang^{1*}, Hà Ngọc Khoán¹, Bùi Thanh Rin¹, Nguyễn Trung Dũng¹, Phạm Tuấn Linh¹,
Nguyễn Thị Hải Yến¹, Đoàn Thị Thu Hiền²

¹Trung tâm Máy gia tốc 30 MeV, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

²Viện Công nghệ Xạ hiếm, Viện Năng lượng Nguyên tử Việt Nam

Ngày nhận bài 29/1/2021; ngày chuyển phản biện 4/2/2021; ngày nhận phản biện 2/3/2021; ngày chấp nhận đăng 16/3/2021

Tóm tắt:

Dược chất phóng xạ ^{18}F Fluoromethylcholine (^{18}F -Choline, ^{18}F -FCH) được sản xuất trên thiết bị tổng hợp tự động tại Trung tâm Máy gia tốc 30 MeV, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108. Để được cấp phép dùng cho người bệnh, dược chất phóng xạ ^{18}F -FCH cần đạt các chỉ tiêu chất lượng theo yêu cầu của Dược điển. Mục tiêu của nghiên cứu này là xây dựng quy trình và thực hành phân tích kiểm tra chất lượng ^{18}F -FCH theo các chỉ tiêu đòi hỏi của Dược điển EuPh2017 đối với dược chất phóng xạ dùng cho thiết bị ghi hình PET. Kết quả thu được khẳng định: tổng thời gian hoàn thành xét nghiệm 1 mẫu ^{18}F -FCH là <35 phút; định danh ^{18}F -FCH, độ tinh khiết hóa phóng xạ và hàm lượng ^{18}F được xác định với độ chính xác >96% bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp; hàm lượng các dung môi dư Ethanol, Acetonitrile, Dibromomethane, Dimethylethanolamine được xác định với độ chính xác >97% bằng phương pháp sắc ký khí.

Từ khóa: dược chất phóng xạ PET, kiểm tra chất lượng ^{18}F -Choline, quy trình phân tích ^{18}F -FCH, ung thư tuyến tiền liệt (PC).

Chỉ số phân loại: 3.2

Đặt vấn đề

Năm 2020, tại Việt Nam ước tính có 182.563 ca mắc mới và 122.690 ca tử vong do ung thư. Cứ 100.000 người thì có 159 người chẩn đoán mắc mới ung thư và 106 người tử vong do ung thư. Việt Nam xếp thứ 91/185 về tỷ suất mắc mới và thứ 50/185 về tỷ suất tử vong trên 100.000 người [1]. Dược chất phóng xạ phổ biến nhất trong nghiên cứu và phát hiện sớm ung thư là ^{18}F Fluoro-Deoxy-Glucose (^{18}F -FDG). Đây là dược chất phóng xạ duy nhất đang được sử dụng cho ghi hình PET, PET/CT để chẩn đoán bệnh ung thư tại 12 bệnh viện trong nước là Trung ương Quân đội 108, Quân y 103, Bạch Mai, Việt Đức, Ung bướu Hà Nội, Vinmec, K Hà Nội, Ung bướu Đà Nẵng, Chợ Rẫy, Quân y 175, Ung bướu TP Hồ Chí Minh và Nhân dân 115. Đối với ung thư tuyến tiền liệt, ^{18}F -FDG định hình khối u thông qua hoạt động chuyển hoá đường Gluco. Tuy nhiên do tốc độ hấp thu ^{18}F -FDG của tế bào khối u tuyến tiền liệt thấp mà hình ảnh thu được không rõ nét, đặc biệt rất khó ghi hình định vị chính xác khối u trong khu vực hố chậu. Dược chất phóng xạ ^{18}F -FCH được xem là có độ nhạy và độ đặc hiệu cao hơn so với ^{18}F -FDG trong ghi hình ung thư tuyến tiền liệt (PC) và ung thư biểu mô tế bào gan (HCC) [2].

Tại châu Âu, dược chất phóng xạ phát xạ positron

^{18}F -FCH đã được sản xuất [3-5] và sử dụng cho ghi hình PET, PET/CT chẩn đoán bệnh PC [6-8], HCC [9, 10] và một số loại bệnh ung thư khác [11, 12]. Chỉ tiêu chất lượng của ^{18}F -FCH dùng cho bệnh nhân đã được liệt kê trong Dược điển EuPh2017 (European Pharmacopoeia 2017, Radiopharmaceutical Preparation 2017, IV-733, 734).

Tại Việt Nam, tính đến 12/2020, không có chỉ định sử dụng ^{18}F -FCH trong chẩn đoán bệnh vì dược chất phóng xạ ^{18}F -FCH chưa được cấp phép, đang trong giai đoạn sản xuất, kiểm tra chất lượng và thử nghiệm tiền lâm sàng trên động vật [12, 13]. Để được cấp phép sử dụng trong nghiên cứu và chẩn đoán bệnh cho người thì ^{18}F -FCH phải thỏa mãn các chỉ tiêu chất lượng của thuốc được ghi trong Dược điển. Vì vậy, kết quả phân tích kiểm tra chất lượng dược chất phóng xạ ^{18}F -FCH là cơ sở dữ liệu có tính quyết định cho cấp phép sản xuất và sử dụng thuốc. Nghiên cứu này nhằm mục đích xây dựng quy trình phân tích kiểm tra, đánh giá chất lượng dược chất phóng xạ ^{18}F -FCH được sản xuất tại Trung tâm Máy gia tốc 30 MeV, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108. Kết quả thu được là cơ sở cho việc cấp phép sản xuất và đưa dược chất phóng xạ này vào thực hành lâm sàng, chẩn đoán thường quy; tăng thêm lựa chọn cho nghiên cứu, chẩn đoán bệnh hiệu quả, đặc biệt là PC và HCC tại Việt Nam.

* Tác giả liên hệ: Email: vtquang.vie@gmail.com

Analytical procedure for quality control of ^{18}F -Choline radiopharmaceutical

Thanh Quang Vu^{1*}, Ngọc Khoan Ha¹, Thanh Rin Bui¹,
Trung Dung Nguyen¹, Tuan Linh Pham¹,
Thi Hai Yen Nguyen¹, Thi Thu Hien Doan²

¹30 MeV Cyclotron Centre, 108 Military Central Hospital

²Institute for Technology of Radioactive and Rare Elements,
Vietnam Atomic Energy Institute

Received 29 January 2021; accepted 16 March 2021

Abstract:

^{18}F Fluoromethylcholine (^{18}F -Choline, ^{18}F -FCH) has been produced using a home-made automatic synthesiser at 30 MeV Cyclotron Centre, 108 Military Central Hospital. In order to be licensed using for patients, the ^{18}F -FCH radiopharmaceutical needs to meet the required quality specifications listed in the pharmacopeia. The objective of this study was to build up the analytical procedure and to perform for the ^{18}F -FCH quality control followed the EuPh2017 pharmacopeia for the PET radiopharmaceutical. The result obtained confirmed that the total time to complete the test of one sample of the ^{18}F -FCH was less than 35 min. Identifications of ^{18}F -FCH, radiochemical purity, and ^{18}F content were determined with accuracy >96% by High-performance liquid chromatography (HPLC) method and content of residual solvents consists of Ethanol, Acetonitrile, Dibromomethane, Dimethylethanolamine were determined with the accuracy >97% by Gas chromatography (GC) method.

Keywords: ^{18}F -Choline quality control, ^{18}F -FCH analytical procedure, PET radiopharmaceutical, prostate cancer (PC).

Classification number: 3.2

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Hóa chất và thiết bị chính

Hóa chất chuẩn để kiểm tra chất lượng ^{18}F -FCH gồm: Kriptofix K222, Dibromomethane (DBM), Dimethylethanolamine (DMEA), Choline chloride, Fluoromethylcholine (FMC), Acetonitrile, Ethanol, Dimethyl sulfoxide (DMSO), Naphthalene-2-sulfonic acid và Phosphoric acid có độ tinh khiết HPLC (Hãng ABX).

Các máy kiểm tra chất lượng ^{18}F -FCH gồm: pH-Meter766 Calimatic (Knick); PTW Curimenter 4 (Freiburg); Endosafe PTS100 (Charles River Lab); sắc ký lỏng cao áp HPLC 1200; sắc ký khí GC6850 (Agilent); sắc ký bản mỏng TLC miniGita và hệ đo Gabi half life time (Raytest).

Phương pháp và quy trình phân tích

Mẫu dùng để phân tích kiểm tra chất lượng ^{18}F -FCH được robot chia liều tự động, trong hotcell có áp suất âm 100-150 bar và độ sạch cấp A. Mẫu thông thường là 1,5-2 ml dung dịch đã qua phin lọc 0,22 μm , có hoạt độ phóng xạ <20 mCi, đựng trong lọ thủy tinh kín, vô trùng. Lọ được đặt trong container chì che chắn phóng xạ. Mở lọ, lấy mẫu được thực hiện sau kính chì L-Block, trong phòng áp lực âm 20 bar, độ sạch mức C. Các chỉ tiêu chất lượng và phương pháp kiểm tra như sau:

- Cảm quan: quan sát bằng mắt mẫu kiểm nghiệm qua kính che chắn phóng xạ (L-block).

- pH: sử dụng pH-Meter766 Calimatic (Knick) hoặc giấy pH (1-14 $\pm$ 0,1). Chuẩn máy bằng 2 dung dịch đệm chuẩn có pH là 4,01 và 9,21. Cảm quang và pH được tiến hành đồng thời khi mở, lấy mẫu kiểm nghiệm vào micropipette. Thời gian thực hiện 1-5 phút. Tiêu chuẩn chấp nhận đạt chất lượng theo EuPh2017 là: mẫu ^{18}F -FCH có pH từ 4,5-8,5; phải trong suốt và không màu hoặc màu vàng nhạt.

- Thời gian bán rã $T_{1/2}$: sử dụng máy đo $T_{1/2}$ hoặc máy đo hoạt độ phóng xạ để xác định thời gian bán phân rã của mẫu. Mẫu xác định $T_{1/2}$ dùng micropipette rỗng của mẫu HPLC hoặc GC. Thời gian ghi đo 15 và 30 phút.

- Định danh và độ tinh khiết hóa phóng xạ: xác định bằng sắc ký lỏng cao áp HPLC 1200 có Reflexive Index Detector và NaI Radiation detector; cột sắc ký Innertsil ODS-2 6x250 mm, kích thước hạt nhựa trao đổi ion 5 μm . Pha động là dung dịch 0,001 M Naphthalene-2-sulfonic acid và 0,05 M Phosphoric acid trong nước HPLC grade; tốc độ dòng 1 ml/phút; bơm 20 μl dung dịch mẫu vào hệ sắc ký, ghi phổ sắc ký và xác định diện tích của các đỉnh chính. Diện tích đỉnh phóng xạ của ^{18}F -FCH không được nhỏ hơn 95% tổng diện tích của các đỉnh có trong mẫu.

Ghi phổ sắc ký mẫu ^{18}F -FCH và mẫu chuẩn Fluoromethylcholine, thời gian ghi phổ 30 phút. Tiêu chuẩn chấp nhận mẫu ^{18}F -FCH đạt chất lượng theo EuPh2017 là

sai số của thời gian lưu (RT) giữa dung dịch mẫu và dung dịch chuẩn $\pm 10\%$; độ tinh khiết hóa phóng xạ $>95\%$.

- ^{18}F và độ tinh khiết hóa phóng xạ: xác định bằng sắc ký bản mỏng TLC, phần mềm MiniGita (Raytest), pha tĩnh là bản mỏng Silicagel trên kính 5×20 cm, dung dịch pha động là 25 ml hỗn hợp Acetonitrile: Saline=1:1 v/v; thể tích mẫu 2 μl ; thời gian phát triển mẫu 20 phút, thời gian ghi phổ 1 phút.

Dùng bút chì kẻ vạch ngang thứ nhất cách mép 1,5 cm của bản mỏng Silicagel; kẻ đường ngang thứ 2 cách đường ngang thứ nhất 10 cm. Lấy 2 μl dung dịch mẫu ^{18}F -FCH chấm vào chính giữa đường ngang thứ nhất, làm khô bản mỏng tự nhiên; sau đó nhúng đầu có xạ vào dung dịch pha động, phát triển đến khi chạm vạch ngang thứ 2 thì nhắc ra, làm khô và đặt lên bản quét theo đúng chiều (vạch chấm xạ ở dưới) và mép dưới bản mỏng trùng với vạch ngang trên bản quét. Bản mỏng nằm giữa và song song với 2 đường dọc trên bản quét. Máy sẽ tự động dừng sau 1 phút quét ghi phổ. Cất bản mỏng vào nơi có che chắn bằng chì. Thời gian hoàn thành phân tích 1 mẫu là <30 phút. Tiêu chuẩn chấp nhận mẫu ^{18}F -FCH đạt chỉ tiêu chất lượng theo EuPh2017 là diện tích đỉnh của ^{18}F -FCH $\geq 95\%$, trong đó ^{18}F $\leq 5\%$ so với tổng diện tích 2 đỉnh ^{18}F và ^{18}F -FCH.

- Dimethylethanolamine (DMEA), Dibromomethane (DBM), Acetonitrile và Ethanol: xác định bằng sắc ký khí (GC6850) dựa vào đường chuẩn của các chất trên. Thể tích mẫu 1 μl ; mỗi điểm nồng độ chuẩn (bảng 1) được xác định lặp 4 lần và lấy giá trị diện tích đỉnh phổ trung bình. Nhiệt độ buồng đốt 170°C , nhiệt độ cột 250°C , lưu lượng khí He qua cột 3 ml/phút, thời gian ghi phổ 30 phút. Tính độ chênh lệch giữa thời gian lưu của dung môi hiện diện trong sản phẩm cuối và dung môi chuẩn theo công thức: độ chênh lệch, % = $(RT_{\text{mẫu}} - RT_{\text{chuẩn}}) / RT_{\text{chuẩn}} \times 100$. Trong đó RT là thời gian lưu. Tiêu chuẩn chấp nhận mẫu ^{18}F -FCH đạt chỉ tiêu chất lượng theo EuPh2017 là độ chênh lệch thời gian lưu $\leq \pm 10\%$; không có đỉnh lạ xuất hiện trên phổ; hàm lượng dung môi còn dư trong sản phẩm ^{18}F -FCH: DMEA $<100 \mu\text{g/ml}$; DBM $<10 \mu\text{g/ml}$; Acetonitrile $<400 \mu\text{g/ml}$ và Ethanol $<5000 \mu\text{g/ml}$.

Bảng 1. Nồng độ các chất chuẩn.

TT	Ethanol (mg/ml)	Acetonitrile (mg/ml)	DMEA (mg/ml)	DBM (mg/ml)
1	0,10	0,20	0,25	1,00
2	0,20	0,40	0,50	2,00
3	0,40	0,80	1,00	4,00
4	0,60	1,20	2,00	8,00

- Kriptofix: dùng phương pháp so màu với 3 mẫu chuẩn Kriptofix có nồng độ: 0,2; 0,04 và 0,02 mg/ml trên bản mỏng Silicagel 2×10 cm. Thời gian phát triển mẫu là 10 phút.

Lấy 1 bản mỏng, dùng bút chì đánh dấu 1 đầu. Nhỏ lần

lượt chất chuẩn Kriptofix2.2.2 ở 3 nồng độ, nồng độ cao ở dưới cách nhau 2 cm. Nhỏ dung dịch mẫu ^{18}F -FCH lên trên cùng, cách Kriptofix2.2.2 chuẩn 3 chừng 2 cm. Đặt bản mỏng vào trong bình chứa iod có nắp đậy, phát triển trong khoảng 10 phút. Lấy bản mỏng ra, so màu với các chấm dung dịch chuẩn. Nếu không xuất hiện màu hoặc màu nhạt hơn chuẩn 3 thì lượng Kriptofix2.2.2 dư của mẫu là $<0,02$ mg/ml. Nếu mẫu thử có màu nhạt hơn chuẩn 2 thì Kriptofix2.2.2 dư là $<0,04$ mg/ml và tương tự $<0,2$ mg/ml. Tiêu chuẩn chấp nhận mẫu ^{18}F -FCH đạt chỉ tiêu chất lượng theo EuPh2017 là hàm lượng Kriptofix không được vượt quá 0,04 mg/ml.

- Nội độc tố vi khuẩn Endotoxin: xác định bằng phương pháp LAN trên máy Endosafe PTS100, dùng cartridge chuẩn của hãng Charles River Lab gồm 4 giếng đo đã chứa chất chuẩn.

Lấy 0,5-1 μl mẫu, nhỏ đều vào 4 giếng, nạp vào máy. Máy sẽ tự động làm mẫu và đo. Thời gian hoàn thành xét nghiệm 1 mẫu <25 phút. Tiêu chuẩn chấp nhận mẫu ^{18}F -FCH đạt chỉ tiêu chất lượng theo EuPh2017 là hàm lượng Endotoxin $\leq 17,5$ EU/ml.

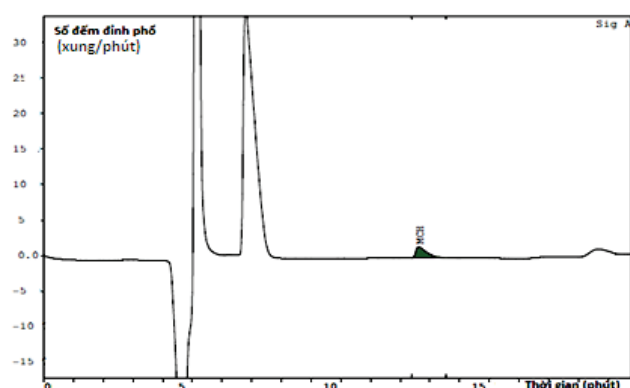
- Vô trùng: xác định trên cơ sở kết quả cấy khuẩn.

Kết quả và thảo luận

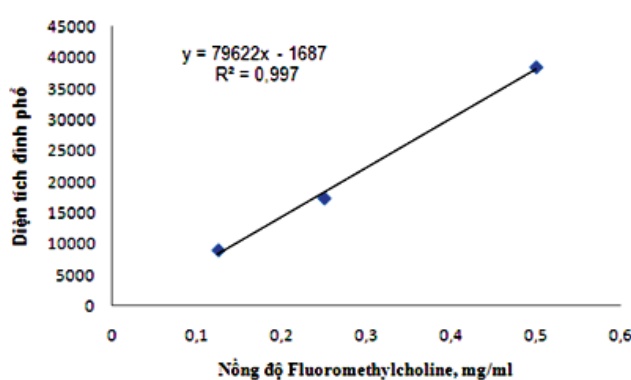
Dược chất phóng xạ ^{18}F -FCH được tổng hợp tự động theo quy trình 8 bước [13]. Sản phẩm ^{18}F -FCH có thể tích 5 ml được chia thành các liều lưu kho, kiểm nghiệm và các liều đơn cho từng bệnh nhân. Dược chất phóng xạ ^{18}F -FCH chỉ được phép sử dụng cho bệnh nhân khi đạt tất cả các chỉ tiêu chất lượng ghi trong Dược điển, trừ chỉ tiêu độ vô trùng được xác nhận sau 2 tuần. Thời gian bán rã của ^{18}F là 109,77 phút, vì vậy thời gian thực hiện các phân tích kiểm tra chất lượng càng ngắn càng tốt. Trong nghiên cứu này, thời gian thực hiện kiểm tra chất lượng 1 mẫu ^{18}F -FCH là <35 phút, tương đương thời gian xét nghiệm 1 mẫu ^{18}F -FDG. Tất cả các xét nghiệm được tiến hành đồng thời.

Định danh và xác định độ tinh khiết hóa phóng xạ theo phương pháp HPLC

Hình 1 là phổ sắc ký HPLC của mẫu chuẩn Fluoromethylcholine có nồng độ 0,5 mg/ml. Quan hệ giữa diện tích đỉnh phổ và nồng độ Fluoromethylcholine cho phép xây dựng đường chuẩn xác định hàm lượng ^{18}F -FCH trong mẫu phân tích. Với 3 điểm nồng độ chuẩn khác nhau, phổ sắc ký HPLC cho số liệu dựng đường chuẩn hình 2. Trên cơ sở phương trình đường chuẩn này, độ chính xác của phương pháp HPLC được xác định là $>99,2\%$ và được biểu diễn trong bảng 2. Thời gian lưu định danh của Fluoromethylcholine được xác định trong khoảng 13,9-14,2 phút.



Hình 1. Phổ sắc ký HPLC của mẫu chuẩn Fluoromethylcholine.



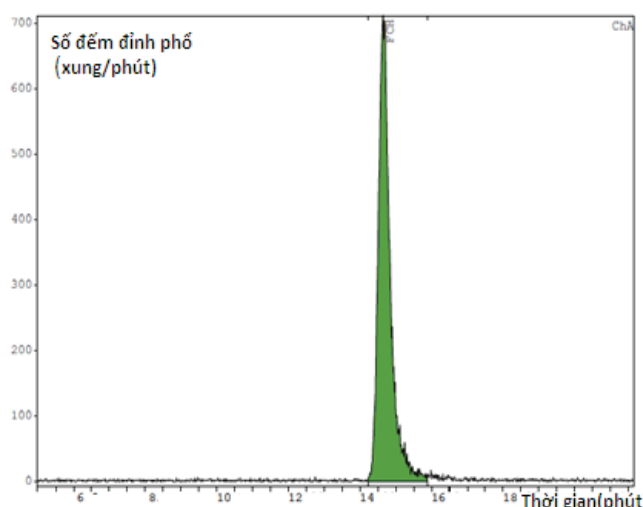
Hình 2. Đường chuẩn xác định Fluoromethylcholine trên HPLC.

Bảng 2. Thời gian lưu định danh và độ chính xác của phương pháp HPLC.

Mẫu chuẩn FMC	Nồng độ FMC chuẩn, C_{std} (mg/ml)	Thời gian lưu RT (phút)	Nồng độ FMC xác định từ đường chuẩn hình 2, C_{calc} (mg/ml)	Độ chính xác tương đối (%)
M1	0,125	12,87±1,29	0,132801	93,76
M2	0,250	12,78±1,28	0,238279	95,31
M3	0,500	12,63±1,26	0,503896	99,22
Độ chính xác trung bình (%)				96,09

Trong đó: độ chính xác tương đối (%) = $100 \cdot [100 \cdot (ABS(C_{std} - C_{calc}) / C_{std})]$.
Độ chính xác trung bình (%) là trung bình cộng của độ chính xác tương đối.

Áp dụng phương pháp HPLC đối với mẫu được chất phóng xạ ^{18}F -FCH thuộc 3 lô khác nhau. Kết quả trình bày trên hình 3 và bảng 3. Phổ sắc ký HPLC của tất cả 3 mẫu đều chỉ có 1 đỉnh duy nhất chiếm 100% diện tích toàn phổ và có thời gian lưu trong khoảng 13,9-14,2 phút là thời gian lưu định danh của chất chuẩn FMC. Chứng tỏ mẫu phân tích chứa chất phóng xạ duy nhất là ^{18}F -FCH với hàm lượng 100% và không có ^{18}F tự do. Kết quả này được khẳng định thêm bằng phương pháp phân tích phổ sắc ký bản mỏng TLC.



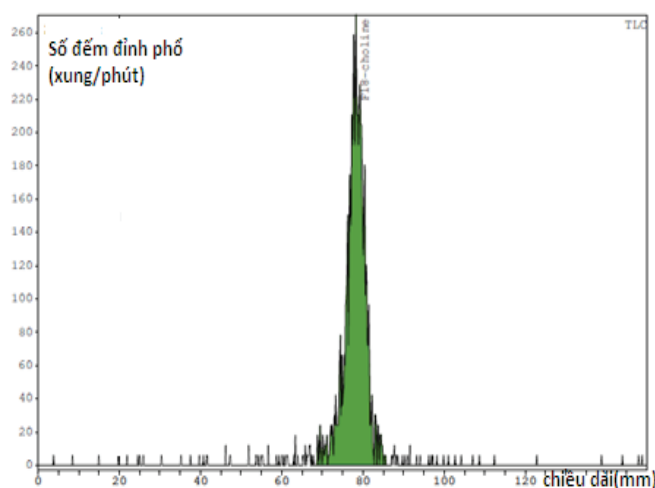
Hình 3. Phổ sắc ký HPLC của mẫu ^{18}F -FCH, RT=14,15 phút.

Bảng 3. Định danh và độ tinh khiết hóa phóng xạ của 3 mẫu ^{18}F -FCH xác định bằng phương pháp HPLC.

Mẫu ^{18}F -FCH	Số lượng đỉnh phổ	RT (phút)	% diện tích đỉnh phổ	Hàm lượng ^{18}F -FCH (%)	Hàm lượng ^{18}F (%)
FCH-19-4-20	1	13,88	100,0	100,0	0,0
FCH-05-12-20	1	14,17	100,0	100,0	0,0
FCH-04-12-20	1	14,15	100,0	100,0	0,0

Xác định độ tinh khiết hóa phóng xạ theo phương pháp TLC

Phổ sắc ký TLC của mẫu ^{318}F -FCH đều có 1 đỉnh với diện tích >95% diện tích toàn phổ, chứng tỏ mẫu chỉ có 1 chất phóng xạ duy nhất với độ tinh khiết là 100% (hình 4, bảng 4).



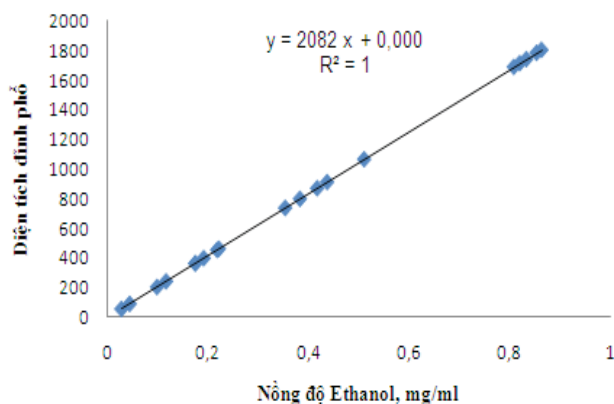
Hình 4. Phổ sắc ký TLC của mẫu ^{18}F -FCH, RT=89,07 mm.

Bảng 4. Độ tinh khiết hóa phóng xạ của 3 mẫu ^{18}F -FCH xác định bằng phương pháp TLC.

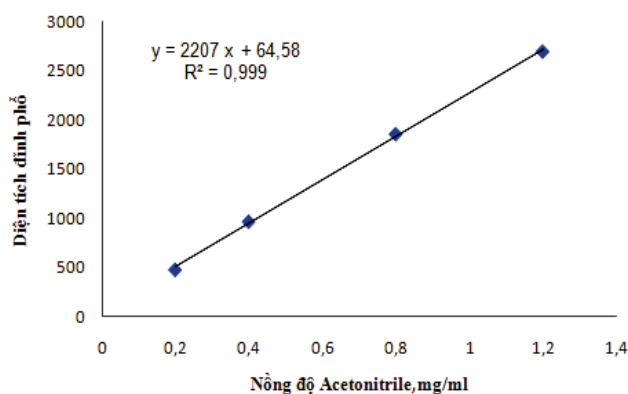
Mẫu ^{18}F -FCH	Số lượng đỉnh phổ	RT, mm	% diện tích đỉnh phổ	Hàm lượng ^{18}F -FCH (%)	Hàm lượng ^{18}F , (%)
FCH-19-4-20	1	87,41	96,76	100,0	0,0
FCH-05-12-20	1	91,40	95,63	100,0	0,0
FCH-04-12-20	1	89,07	96,82	100,0	0,0

Xác định dung môi dư

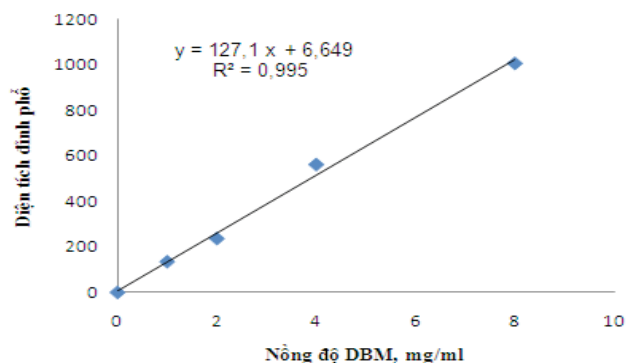
Phổ sắc ký GC của mẫu chuẩn cho biết thời gian lưu định danh và diện tích đỉnh phổ của mỗi chất. Thời gian lưu định danh của Ethanol, Acetonitrile, DBM và DMEA được xác định là $3,22 \pm 0,10$, $3,53 \pm 0,10$, $8,46 \pm 0,10$ và $16,40 \pm 0,10$ phút. Đường chuẩn định lượng mỗi chất được xây dựng từ tương quan giữa nồng độ (bảng 1) và diện tích đỉnh phổ. Kết quả được trình bày trong các hình 5, 6, 7, 8. Trên cơ sở phương trình đường chuẩn và nồng độ chuẩn của các chất, độ chính xác của phương pháp GC được xác định. Kết quả trình bày trong bảng 5.



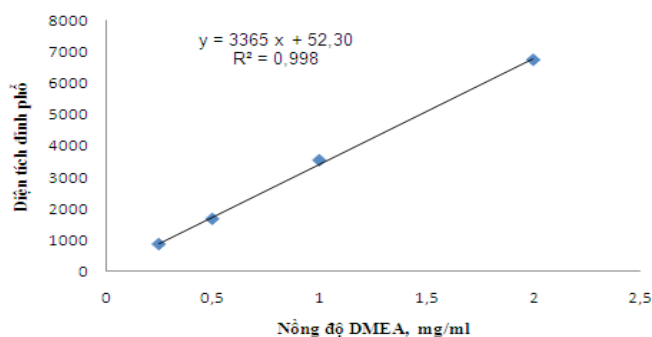
Hình 5. Đường chuẩn xác định Ethanol trên GC6850.



Hình 6. Đường chuẩn xác định Acetonitrile trên GC6850.



Hình 7. Đường chuẩn xác định Dibromomethane (DBM) trên GC6850.



Hình 8. Đường chuẩn xác định Dimethylethanolamine (DMEA) trên GC6850.

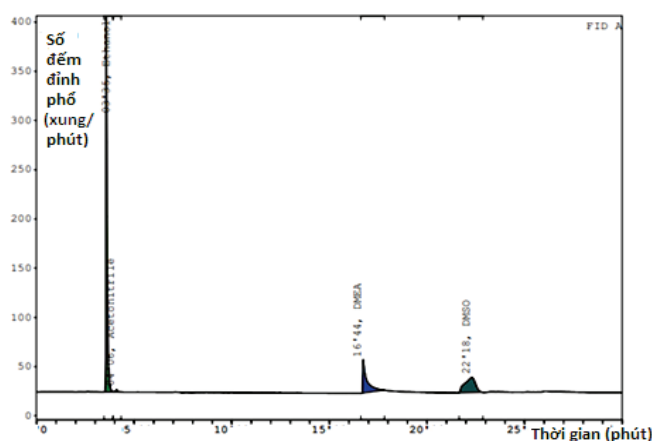
Bảng 5. Thời gian lưu định danh và độ chính xác của phương pháp GC.

Chất chuẩn	Nồng độ mẫu chuẩn C_{std} (mg/ml)	RT (phút)	Nồng độ xác định từ đường chuẩn C_{calc} (mg/ml)	Độ chính xác tương đối (%)
Ethanol	0,1	$3,22 \pm 0,10$	0,096388	96,388
	0,2	$3,22 \pm 0,10$	0,200344	99,828
	0,4	$3,22 \pm 0,10$	0,408385	97,903
	0,6	$3,22 \pm 0,10$	0,594937	99,516
Độ chính xác trung bình, %				98,31
Acetonitrile	0,2	$3,53 \pm 0,10$	0,187986	93,99
	0,4	$3,53 \pm 0,10$	0,409234	97,69
	0,8	$3,53 \pm 0,10$	0,811977	98,50
	1,2	$3,53 \pm 0,10$	1,191311	99,27
Độ chính xác trung bình, %				97,36
DBM	1,0	$8,46 \pm 0,10$	1,011529	99,98
	2,0	$8,46 \pm 0,10$	1,810618	99,90
	4,0	$8,46 \pm 0,10$	4,369501	99,90
	8,0	$8,46 \pm 0,10$	7,862303	99,98
Độ chính xác trung bình, %				99,94
DMEA	0,25	$16,40 \pm 0,10$	0,243905	99,97
	0,5	$16,40 \pm 0,10$	0,482605	99,96
	1,0	$16,40 \pm 0,10$	1,037287	99,96
	2,0	$16,40 \pm 0,10$	1,987103	99,99
Độ chính xác trung bình, %				99,97

Trong đó: độ chính xác tương đối là tỷ số giữa nồng độ tính được theo đường chuẩn và nồng độ của mẫu chuẩn. Mỗi chất chuẩn được tính ở 4 điểm nồng độ khác nhau. Giá trị trung bình của độ chính xác tương đối là độ chính xác của phương pháp GC.

Kết quả thu được trong bảng 5 cho thấy: phương pháp GC cho phép xác định đồng thời Ethanol, Acetonitrile, DBM và DMEA với độ chính xác >97%. Thời gian hoàn thành xét nghiệm 1 mẫu là <30 phút.

Áp dụng phương pháp GC cho 3 mẫu ^{18}F -FCH. Kết quả ghi phổ GC biểu diễn trên hình 9 có 4 đỉnh được định danh tự động là Ethanol, Acetonitrile, DMEA và DMSO, không ghi nhận đỉnh DBM. Kết quả xác định hàm lượng các dung môi dư được ghi trong bảng 6. Kết quả phân tích cho thấy, hàm lượng dung môi dư Ethanol, Acetonitrile, DBM và DMEA trong các mẫu FCH-19-4-20 và FCH-5-12-20 đều trong khoảng chấp nhận theo tiêu chuẩn Dược điển EuPh2017. Mẫu FCH-04-12-20 không đạt tiêu chuẩn chất lượng vì hàm lượng DMEA tồn dư trong mẫu là 130,299 $\mu\text{g/ml}$, lớn hơn tiêu chuẩn 100 $\mu\text{g/l}$. Trên phổ GC hình 9 cũng chỉ ra sự có mặt của dung môi DMSO (RT=22,18 phút) dùng để hòa tan DMEA. Dược điển EuPh2017 không đòi hỏi xác định chỉ tiêu này.



Hình 9. Phổ sắc ký GC của mẫu FCH-04-12-20.

Bảng 6. Hàm lượng dung môi tồn dư trong 3 mẫu ^{18}F -FCH.

Ký hiệu mẫu ^{18}F -FCH	Dung môi	RT (phút)	Diện tích đỉnh phổ	Hàm lượng dung môi trong mẫu ^{18}F -FCH ($\mu\text{g/ml}$)
FCH-19-4-20	Ethanol	3,21	457,52	219,73
	Acetonitrile	-	0,0	<1
	DBM	-	0,0	<1
	DMEA	13,31	239,73	55,701
FCH-05-12-20	Ethanol	3,35	1737,712	834,55
	Acetonitrile	4,06	14,154	6,64
	DBM	-	0,0	<1
	DMEA	17,0	359,498	91,292
FCH-04-12-20	Ethanol	3,35	1686,261	809,84
	Acetonitrile	4,06	15,584	7,31
	DBM	-	0,0	<1
	DMEA	16,44	490,732	130,299

Xác định hàm Kriptopix

Dùng phương pháp so màu với 3 mẫu chuẩn Kriptofix có nồng độ: 0,2; 0,04 và 0,02 mg/ml trên bản mỏng Silicagel 2x10 cm. Thời gian phát triển mẫu là 10 phút. Kết quả thu được khẳng định 3 mẫu thử trên có hàm lượng Kriptofix <0,04 mg/ml, thỏa mãn yêu cầu chất lượng theo Dược điển EuPh 2017.

Phương pháp LAN trên máy Endosafe PTS100: xác định Endotoxin

Phương pháp này được áp dụng cùng 1 quy trình cho tất cả các mẫu như ^{18}F -FDG hay ^{18}F -FCH. Sử dụng thẻ chuẩn (Standard Cartridge) của Hãng Charles River Lab. Các mẫu kiểm tra trong nghiên cứu này đều đạt chỉ tiêu chất lượng endotoxin <17,5 EU/ml. pH và $T_{1/2}$: tất cả 3 mẫu ^{18}F -FCH đều có pH=6-7 $\pm$ 0,1 và $T_{1/2}$ =105 $\pm$ 5 phút, đạt chỉ tiêu chất lượng theo Dược điển EuPh2017.

Các kết quả phân tích 3 mẫu ^{18}F -FCH nêu trên cho thấy: 1 mẻ thuốc sản xuất ngày 4/12/2020 (FCH-04-12-20) có chỉ tiêu DMEA tồn dư lớn hơn tiêu chuẩn cho phép, không đủ tiêu chuẩn chất lượng thuốc sử dụng cho người bệnh. Để giảm nồng độ DMEA tồn dư trong sản phẩm, cần hiệu chỉnh các thông số của bước 6, 7, 8 trong quy trình tổng hợp tự động dcpx ^{18}F -FCH [13, 14]. Hai mẻ còn lại đáp ứng đủ tiêu chuẩn chất lượng theo Dược điển EuPh2017 của thuốc dùng cho bệnh nhân.

Kết luận

Thuốc phóng xạ positron ^{18}F -FCH liên tục phân rã với tốc độ giảm hoạt độ còn 1/2 trong thời gian 1 chu kỳ bán rã, nghĩa là giá thành tăng gấp đôi cho 1 liều thuốc và số bệnh nhân có cơ hội được dùng thuốc cũng giảm tương ứng. Vì vậy, phương pháp phân tích kiểm tra chất lượng ^{18}F -FCH cần phải được thực hiện nhanh, đủ, chính xác các chỉ tiêu xét nghiệm với thời gian ít nhất có thể. Trong nghiên cứu này, quy trình phân tích kiểm tra chất lượng ^{18}F -FCH được thực hiện đồng thời trên các thiết bị HPLC, TLC, GC, Gabi Half Time, Endosafe PTS 100 kết nối qua mạng LAN; kết quả phân tích được truyền về máy tính chủ và kết xuất ra máy in. Thời gian hoàn thành phân tích kiểm tra chất lượng 1 mẫu ^{18}F -FCH là <35 phút, tương đương thời gian kiểm nghiệm 1 mẫu ^{18}F -FDG. Phương pháp phân tích HPLC không những định danh chính xác các thành phần hóa học của mẫu ^{18}F -FCH mà còn xác định độ tinh khiết hóa phóng xạ với độ chính xác >96%. Phương pháp GC cho phép xác định đồng thời các dung môi tồn dư trong mẫu với độ chính xác >97%.

Phương pháp phân tích nhanh, đủ và chính xác các chỉ tiêu chất lượng của mẫu ^{18}F -FCH không những trợ giúp hiệu

quả cho việc hiệu chỉnh, lựa chọn quy trình tổng hợp tối ưu mà còn là cơ sở dữ liệu quan trọng cho cấp phép sản xuất và sử dụng thuốc ^{18}F -FCH trong nghiên cứu và chẩn đoán bệnh; mở ra khả năng phá vỡ thế độc tôn duy nhất từ năm 2008 của dược chất phóng xạ ^{18}F -FDG; cung cấp nhiều hơn 1 lựa chọn chỉ định PET, PET/CT; hỗ trợ chẩn đoán chính xác, đặc hiệu và điều trị hiệu quả đối với một số bệnh ung thư, đặc biệt là ung thư tuyến tiền liệt và ung thư biểu mô tế bào gan tại Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Bộ Y tế (2021), *Tình hình ung thư tại Việt Nam*, Cổng thông tin điện tử, moh.gov.vn, ngày 19/1/2021.
- [2] Shankar Vallabhajosula (2007), “ ^{18}F -Labeled positron emission tomographic radiopharmaceuticals in oncology: an overview of radiochemistry and mechanisms of tumor localization”, *Seminars in Nuclear Medicine*, **37**(6), pp.400-419.
- [3] X. Shao, et al. (2011), “Highlighting the versatility of the tracerlab synthesis modules. Part I: fully automated production of ^{18}F labelled radiopharmaceuticals using a Tracerlab FxN”, *J. Label Compd. Radiopharm*, **54**, pp.292-307.
- [4] Alessandro Sperandio, et al. (2014), “Automated synthesis of ^{18}F fluorocholine using a modified GE Tracer Lab module”, *Journal of Diagnostic Imaging in Therapy*, **1**(1), pp.49-58.
- [5] Y.Y. Huang, et al. (2017), “High yield one-pot production of ^{18}F FCH via a modified TRACERlab FxN module”, *Applied Radiation and Isotopes*, **128**, pp.190-198.
- [6] M. Playe, T. Cassou Mounat, L. Champion (2020), “ ^{18}F -choline PET/CT in prostate cancer biochemical relapse after external beam radiotherapy or brachytherapy: impact of PSA and kinetics”, *Médecine Nucléaire*, **44**(1), pp.53-64.
- [7] J.R.M. Garcia, M. Cozar, P. Soler, E. Bassa, M. Riera, E. Buxeda, J. Valls (2020), “Standardization of acquisition protocols using PET/CT with ^{18}F -Choline in prostate cancer”, *Revista Española de Medicina Nuclear e Imagen Molecular*, **39**(4), pp.204-211.
- [8] Eric Vigneault, Damien Carignan, Frédéric Pouliot, André Guy Martin (2019), “Feasibility of intraprostatic prostate cancer imaging with FCH-PET/CT for preoperative planning of image-guided HDR brachytherapy”, *Brachytherapy*, p.72.
- [9] J.N. Talbot, L. Fartoux, S. Balogova, V. Nataf, K. Kerrou, F. Gutman, V. Huchet, D. Ancel, J.D. Grange, O. Rosmorduc (2010), “Detection of hepatocellular carcinoma with PET/CT: a prospective comparison of ^{18}F -fluorocholine and ^{18}F -FDG in patients with cirrhosis or chronic liver disease”, *J. Nucl. Med.*, **51**(11), pp.1699-1706.
- [10] Julia Chalaye, Charlotte E. Costentin, Ala in Luciani, Giuliana Amaddeo (2018), “Positron emission tomography/computed tomography with ^{18}F -fluorocholine improve tumor staging and treatment allocation in patients with hepatocellular carcinoma”, *Journal of Hepatology*, **69**(2), pp.336-344.
- [11] G. Savelli, M. Bonacina, A. Rizzo, A. Zaniboni (2020), “Activated macrophages are the main inflammatory cell in COVID-19 interstitial pneumonia infiltrates. Is it possible to show their metabolic activity and thus the grade of inflammatory burden with ^{18}F -Fluorocholine PET/CT?”, *Medical Hypotheses*, **144**, p.109885.
- [12] Laura Olivari, Niccolò Riccardi, Paola Rodari, Andrea Angheben, Paolo Artioli, Matteo Salgarello (2020), “COVID-19 pneumonia: increased choline uptake with ^{18}F -choline PET/CT”, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, **47**, pp.2476-2477.
- [13] Vũ Thanh Quang, Hà Ngọc Khoán, Bùi Thanh Rìn, Nguyễn Trung Dũng (2019), *Nghiên cứu chế tạo máy tổng hợp tự động dược chất phóng xạ ^{18}F -FCH dùng cho PET/CT*, Hội thảo VINANST-13, Hạ Long, Quảng Ninh.
- [14] Vũ Thanh Quang, Hà Ngọc Khoán, Bùi Thanh Rìn, Nguyễn Trung Dũng, Phạm Tuấn Linh, Đoàn Thị Thu Hiền (2020) “Nghiên cứu điều chế dược chất phóng xạ ^{18}F -Choline tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, **62**(11), tr.59-64.

Nghiên cứu đặc điểm người bệnh chạy thận nhân tạo tại 26 bệnh viện của Hà Nội năm 2020

Hoàng Giang^{1*}, Trịnh Hồng Sơn¹, Lê Thị Kim Nhung¹, Ngô Thị Huyền¹,
Vũ Thị Hồng Vân¹, Trần Đức Hùng², Nguyễn Dương Hùng², Hoàng Văn Thông³, Trần Tuấn Anh⁴,
Nguyễn Văn Thành⁴, Nguyễn Thành Đạt⁵, Vũ Tá Nam⁶, Nguyễn Hữu Sâm⁷, Hà Trung Chính⁸

¹Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức

²Bệnh viện Đa khoa Tâm Anh

³Bệnh viện Đa khoa Đức Giang

⁴Bệnh viện Bãi Cháy

⁵Bệnh viện Nông nghiệp

⁶Bệnh viện Đa khoa Hà Đông

⁷Bệnh viện Xanh Pôn

⁸Bệnh viện Thanh Nhàn

Ngày nhận bài 26/1/2021; ngày chuyển phản biện 4/2/2021; ngày nhận phản biện 8/3/2021; ngày chấp nhận đăng 15/3/2021

Tóm tắt:

Ghép thận đã trở thành lựa chọn cho nhiều người bệnh suy thận giai đoạn cuối. Tuy nhiên, không phải tất cả người bệnh đều có khả năng được ghép thận. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định một số đặc điểm của người bệnh chạy thận nhân tạo (TNT) có chỉ định ghép thận tại 26 bệnh viện của TP Hà Nội. Kết quả cho thấy, năm 2020 Hà Nội có 3.220 người bệnh đang chạy thận với tuổi trung bình là 54 (tập trung chủ yếu 46-65 tuổi), nam nhiều hơn nữ. Hơn 95% nguyên nhân chạy thận là viêm cầu thận mạn, tăng huyết áp và tiểu đường; thời gian chạy thận trên 5 năm lên đến trên 65%, người bệnh nhóm máu O chiếm 43% và 25% người bệnh đang chạy thận mắc viêm gan C. Trong tổng số 3.220 người bệnh, có 2.400 người (74%) có chỉ định ghép thận với tuổi trung bình là gần 49, trong đó nam (55%) nhiều hơn nữ (45%); thời gian chạy thận dưới 5 năm chiếm tỷ lệ cao nhất với 43%, 25% người bệnh có chỉ định ghép thận có HCV dương tính; suy thận mạn do viêm cầu thận mạn và tăng huyết áp, tiểu đường là 2 nhóm nguyên nhân chính chiếm đến 94% số người bệnh đang chạy thận có chỉ định ghép.

Từ khóa: chạy thận nhân tạo, ghép thận, lọc máu, trung tâm ghép.

Chỉ số phân loại: 3.3

Đặt vấn đề

Ghép tạng là một trong những thành tựu lớn của y học trong thế kỷ XX, giúp cải thiện và kéo dài cuộc sống của hàng trăm nghìn người bệnh trên toàn thế giới mỗi năm [1]. Sau thành công của ca ghép thận đầu tiên vào năm 1954 tại Hoa Kỳ, cùng với những phát triển vượt bậc về kỹ thuật, trang thiết bị, liệu pháp ức chế miễn dịch thì phẫu thuật ghép thận đã trở thành lựa chọn cho nhiều người bệnh suy thận giai đoạn cuối [2]. Ghép thận nói riêng và ghép tạng nói chung chỉ được thực hiện thành công khi tuân thủ chặt chẽ 4 bước: i) Chuẩn bị người nhận; ii) Chuẩn bị người cho; iii) Chuẩn bị về nhân lực và kỹ thuật; và iv) Xây dựng kế hoạch năm viện, theo dõi và chăm sóc sau ghép. Danh sách người bệnh chờ ghép đóng vai trò quan trọng trong việc chuẩn bị và lựa chọn người nhận. Tại các nước tiên tiến, mạng lưới điều phối ghép tạng được thành lập với vai trò quan trọng của việc xây dựng danh sách những người bệnh mong muốn chờ ghép, những người hiến tạng, kiểm soát ghép cấp dựa trên thứ tự ưu tiên là nền tảng pháp luật chặt chẽ. Tại Việt Nam, đứng trước nhu cầu thiết yếu để phát triển chuyên ngành ghép tạng, Trung tâm Điều phối quốc gia về ghép bộ

phận cơ thể người được thành lập vào năm 2013 với mục tiêu đảm nhiệm các vai trò tương tự như ở các nước trên thế giới. Tuy nhiên cho đến nay, việc xây dựng danh sách chờ ghép vẫn còn là thách thức. Để có một đánh giá đầy đủ về người bệnh đang chạy TNT có chỉ định ghép thận tại TP Hà Nội, từ đó nhân rộng ra trên cả nước, đồng thời xác định những khó khăn, vướng mắc trong quá trình triển khai, chúng tôi tiến hành “Nghiên cứu đặc điểm người bệnh chạy TNT tại 26 bệnh viện của TP Hà Nội năm 2020” với mục tiêu: xác định danh sách người bệnh chạy TNT có chỉ định ghép thận của 26 bệnh viện tại TP Hà Nội năm 2020; xác định một số đặc điểm của người bệnh chạy TNT có chỉ định ghép thận tại đây.

Đối tượng và phương pháp

Đối tượng nghiên cứu là những người bệnh đang chạy TNT chu kỳ tại các bệnh viện có đơn vị chạy TNT tại Hà Nội (26 bệnh viện) thỏa mãn các tiêu chí lựa chọn và loại trừ sau:

Tiêu chuẩn lựa chọn: người bệnh đang chạy TNT chu kỳ.

Tiêu chuẩn loại trừ: 1) Người bệnh đang lọc máu màng bụng; 2)

*Tác giả liên hệ: Email: giangbvvd@gmail.com

Characteristics of the patient with hemodialysis from 26 hospitals in Hanoi by 2020

Giang Hoang^{1*}, Hong Son Trinh¹, Thi Kim Nhung Le¹,
Thi Huyen Ngo¹, Thi Hong Van Vu¹, Duc Hung Tran²,
Duong Hung Nguyen², Van Thong Hoang³,
Tuan Anh Tran⁴, Van Thanh Nguyen⁴,
Thanh Dat Nguyen⁵, Ta Nam Vu⁶, Huu Sam Nguyen⁷,
Trung Chinh Ha⁸

¹Viet Duc University Hospital

²Tam Anh Hospital

³Duc Giang Hospital

⁴Bai Chay Hospital

⁵General Hospital of Agriculture

⁶Ha Dong Hospital

⁷Xanh Pon Hospital

⁸Thanh Nhan Hospital

Received 26 January 2021; accepted 15 March 2021

Abstract:

A kidney transplant has become an option for many people with end-stage kidney failure. However, not all patients are likely to receive a kidney transplant. This study is conducted to identify some characteristics of patients with renal transplant indications for kidney transplantation from 26 hospitals in Hanoi. According to the research results, in 2020, Hanoi has 3,220 patients on dialysis with the average age of 54, mainly from 46-65, more males than females. More than 95% of the causes of dialysis are chronic glomerulonephritis, hypertension, and diabetes; up to 65% of the dialysis time is over 5 years, blood type O patients account for 43% and 25% of dialysis patients with hepatitis C. Out of a total of 3,220 patients, 2,400 (74%) of patients have indicated a kidney transplant with an average age of nearly 49 years, of which men (55%) are more than women (45%); dialysis time less than 5 years accounts for the highest percentage with 43%, 25% of patients with indicated kidney transplantation are HCV positive; chronic kidney failure due to chronic glomerulonephritis and hypertension, diabetes are two main groups of causes, accounting for 94% of dialysis patients who are indicated for transplant.

Keywords: dialysis, hemodialysis, kidney transplant, transplant center.

Classification number: 3.3

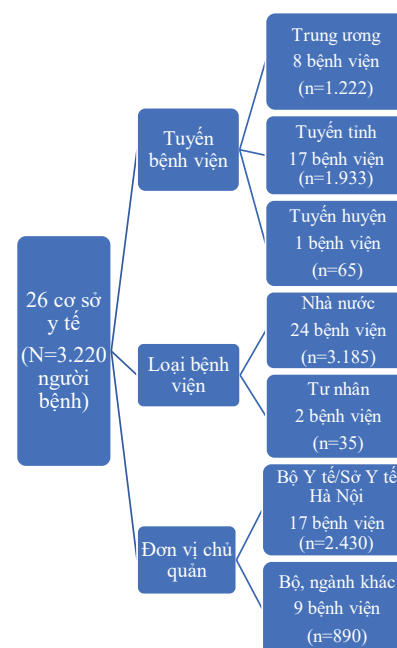
Người bệnh đang chạy TNT cấp cứu; 3) Người bệnh suy thận giai đoạn 3b có chỉ định ghép thận nhưng chưa phải chạy TNT chu kỳ.

Phương pháp nghiên cứu mô tả cắt ngang. Nghiên cứu được tiến hành tại toàn bộ các bệnh viện có đơn vị chạy TNT ở Hà Nội (26 bệnh viện). Thời gian nghiên cứu từ tháng 9/2018 đến 9/2020.

Tất cả người bệnh thỏa mãn tiêu chuẩn lựa chọn và loại trừ đều được đưa vào nghiên cứu. Thông tin người bệnh được thu thập từ bệnh án nghiên cứu. Quản lý và xử lý số liệu trên phần mềm SPSS và Excel.

Kết quả và bàn luận

Mạng lưới cơ sở chạy TNT tại Hà Nội

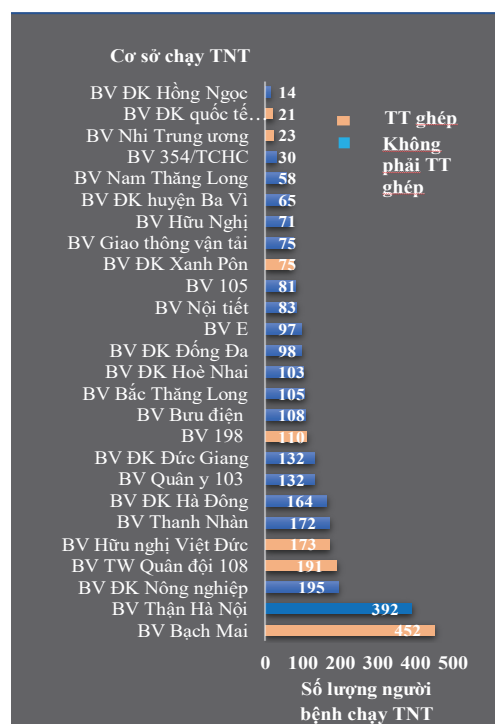


Hình 1. Mạng lưới các cơ sở chạy TNT tại Hà Nội năm 2020.

Tổng số các cơ sở chạy TNT tại Hà Nội là 26 với 3.220 người bệnh. Hầu hết các cơ sở chạy TNT đều thuộc các bệnh viện tuyển tỉnh và tuyển trung ương, chỉ có 1 đơn vị chạy TNT thuộc tuyển huyện được đặt tại Ba Vì (hình 1). Tính đến năm 2019, dân số Hà Nội là khoảng 8.053.663 người [3], như vậy ước tính với khoảng 3.220 người bệnh chạy TNT chu kỳ thì tỷ lệ số lượng người bệnh chạy thận trên 1 triệu dân là 399. Kết quả này cao hơn so với công bố của Phạm Văn Bùi với 310 người bệnh/triệu dân [3]. Điều này được giải thích bởi Hà Nội là một thành phố trực thuộc trung ương, với mật độ dân số cao thứ 2 của cả nước. Để đáp ứng được nhu cầu chạy TNT của người bệnh thì việc triển khai hoạt động nhiều cơ sở chạy TNT là cần thiết nhằm đảm bảo nhu cầu tối thiểu của người bệnh. Bên cạnh đó, sự tham gia của các đơn vị tư nhân cũng như sự phối hợp của nhiều hệ thống bệnh viện của các bộ, ngành cho phép người bệnh có thể tiếp cận được dịch vụ chạy TNT một cách dễ dàng và nâng cao chất lượng điều trị.

Phân bố người bệnh chạy TNT tại các bệnh viện có ghép thận và không có ghép thận

Trong tổng số 26 bệnh viện có chạy TNT tại Hà Nội có 7 bệnh viện có ghép thận (trong đó 4 bệnh viện trực thuộc trung ương). Theo báo cáo của Trung tâm Điều phối ghép tạng quốc gia, tính đến tháng 12/2019 cả nước có 19 trung tâm ghép thận. Như vậy, có 7/19 (37%) số cơ sở ghép thận trên cả nước đóng tại Hà Nội.



Hình 2. Phân bố người bệnh chạy TNT tại các bệnh viện có ghép thận và không có ghép thận. BV: bệnh viện; ĐK: đa khoa; TCHC: Tổng cục Hậu cần; TW: Trung ương; TT: trung tâm.

Kết quả hình 2 cho thấy, nhóm 5 bệnh viện có số lượng người bệnh chạy TNT nhiều nhất bao gồm: Bệnh viện Bạch Mai (452), Bệnh viện Thận Hà Nội (392), Bệnh viện Đa khoa Nông nghiệp (195), Bệnh viện Trung ương Quân đội 108 (191) và Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức (173). Tất cả các bệnh viện này đều tập trung ở vùng trung tâm của TP Hà Nội, nơi có đông dân cư, ngoài ra 3/5 bệnh viện trên là bệnh viện tuyến trung ương và là các cơ sở ghép thận của miền Bắc. Bệnh viện Thận Hà Nội là một trong những bệnh viện chuyên sâu về chuyên ngành thận học và lọc máu của cả nước. Bệnh viện Đa khoa Nông nghiệp không phải cơ sở ghép thận nhưng là nơi đáp ứng nhu cầu chạy thận của vùng dân cư phía nam thành phố, nơi có ít các cơ sở chạy thận hơn so với các vùng khác và tiếp nhận nhiều bệnh nhân của các tỉnh lân cận. Bệnh viện Đa khoa quốc tế Vinmec và Bệnh viện Đa khoa Hồng Ngọc là 2 cơ sở tư nhân có dịch vụ chạy TNT, tuy số lượng 35 người bệnh là không nhiều, nhưng đây cũng là những bệnh viện giúp cho người bệnh có những trải nghiệm dịch vụ tốt hơn tùy theo khả năng chi trả của người bệnh.

Phân bố người bệnh chạy TNT theo nơi cư trú

Hầu hết người bệnh được lựa chọn vào trong nghiên cứu có địa chỉ tại Hà Nội với 2.445 người bệnh, chiếm 75,9%. Tuy nhiên, cũng có nhiều người bệnh có địa chỉ cư trú ngoài Hà Nội (42 tỉnh, thành phố), đặc biệt là các vùng lân cận như Nam Định, Hưng Yên, Hà Nam, Thái Bình, Bắc Giang có số lượng người bệnh chạy TNT khá cao. Với bán kính dưới 100 km và sự thuận tiện trong quá trình di chuyển là lý do những người bệnh có thể chạy TNT tại Hà Nội. Ngoài ra, cũng có những người bệnh thay đổi nơi ở, di chuyển đến Hà Nội trong thời gian ngắn và cần thực hiện chạy TNT tại các cơ sở chạy TNT tại Hà Nội.

Sự tiếp cận với các dịch vụ chạy TNT này là nhu cầu thiết yếu và dựa trên sự thuận tiện về mặt thời gian và không gian của người bệnh [4].

Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng người bệnh chạy TNT

Tuổi trung bình của người bệnh chạy TNT tại Hà Nội là $53,88 \pm 15,84$. Trong đó, nhóm tuổi 46-65 chiếm tỷ lệ lớn nhất (42,23%) (bảng 1).

Bảng 1. Đặc điểm về tuổi, giới, tiền sử bệnh, nguyên nhân chạy TNT của người bệnh.

Đặc điểm (n=3.220)	Tần số (n)	Tỷ lệ (%)
Nhóm tuổi (n=3.218)		
<18 tuổi	36	1,12
18-45 tuổi	1.001	31,11
46-65 tuổi	1.359	42,23
>65 tuổi	822	25,54
Tuổi trung bình (Mean±SD)	53,88±15,84 (3-99)	
Giới		
Nam	1.710	53,11
Nữ	1.510	46,89
Tổng số phẫu thuật (n=167)		
Ghép thận	30	17,96
Cắt thận	12	7,19
Mổ lấy sỏi thận	22	13,17
Ung thư	13	7,79
Phẫu thuật khác	90	53,89
Nguyên nhân chạy TNT		
Viêm cầu thận mạn	2.747	85,31
Tăng huyết áp, tiểu đường	342	10,62
Sỏi tiết niệu	41	1,27
Thận đa nang	31	0,96
Gan, thận đa nang	16	0,5
Gout	14	0,44
Lupus	22	0,68
Khác	7	0,22
Thời gian chạy TNT (n=1.379)		
<5 năm	475	34,44
5-10 năm	638	46,27
>10 năm	266	19,29

Các đặc điểm về tuổi này có sự tương đồng với nhiều nghiên cứu trên thế giới [5-8]. Độ tuổi trên 60 chiếm một tỷ lệ khá cao trong số những người bệnh chạy TNT. Theo hướng dẫn của Bộ Y tế thì độ tuổi có chỉ định ghép thận khuyến cáo không quá 60. Trên thế giới tỷ lệ ghép thận ở người cao tuổi đang tăng lên và những đánh giá kết quả sau ghép ở những người bệnh này là khả thi hơn so với nhóm không ghép [9, 10]. Tại châu Âu, chương trình ghép tạng nâng cao - Eurotransplant Senior Program (ESP) cho phép người nhận trên 65 sẽ được nhận thận từ người hiến trên 65 [11]. Vấn đề đặt ra là cần có những hướng dẫn cụ thể cho đối tượng người cao tuổi khi thực hiện ghép thận, xác định những lợi ích và rủi ro của ghép so với việc họ sẽ duy trì chạy TNT.

Trong số 167 người bệnh được khai thác rõ tiền sử ghi nhận 30 trường hợp đã từng ghép thận, 34 trường hợp đã từng thực hiện các phẫu thuật liên quan đến thận như cắt thận hoặc lấy sỏi thận. Việc thực hiện các phẫu thuật khác như đặt stent mạch vành cũng là một yếu tố nguy cơ trong quá trình chạy TNT, cần thận trọng khi đưa ra chỉ định ghép thận.

Trong nghiên cứu này, 85,31% người bệnh chạy TNT do nguyên nhân viêm cầu thận mạn, sau đó là các nguyên nhân về tăng huyết áp, đái tháo đường. Số liệu này cũng tương đồng với các nghiên cứu trong nước và quốc tế [5-7].

Thời gian chạy TNT thường trong khoảng 5-10 năm, phụ thuộc rất nhiều vào nguyên nhân và thời gian khởi phát bệnh. Trong nghiên cứu này, phần lớn người bệnh mắc viêm cầu thận mạn nên thời gian chạy thận cũng kéo dài hơn.

Thời gian chờ ghép thận không phải là thời gian chạy thận, mà là thời gian kể từ khi người bệnh đăng ký với các bệnh viện để được vào danh sách chờ ghép, thời gian chờ càng lâu càng được ưu tiên ghép sớm. Vì vậy, việc tiếp cận với danh sách chờ ghép thận càng sớm càng tốt, nó sẽ không phụ thuộc vào thời gian chạy thận nhưng lại ảnh hưởng đến tiên lượng điều trị trong ghép. Theo hướng dẫn của Mạng lưới chia sẻ nội tạng Hoa Kỳ (UNOS), chỉ số ước tính tỷ lệ sống sau ghép của người nhận (Estimated Post Transplant Survival) đóng vai trò quan trọng trong quá trình đánh giá ghép cặp người nhận và người hiến [12].

Trong số 1.125 người bệnh đã các định được nhóm máu có gần một nửa số người bệnh thuộc nhóm máu O (43,29%) (bảng 2). Nhóm máu O đóng vai trò quan trọng trong việc lựa chọn người hiến phù hợp. Theo một vài nghiên cứu thì nhóm máu O có thời gian chờ đợi nhiều nhất, trong khi nhóm máu B có xu hướng chờ đợi thấp nhất. Các nghiên cứu về ghép không cùng nhóm máu cũng được cân nhắc khi mà nguồn hiến tạng còn hạn chế [13].

Người bệnh chạy TNT nhiễm viêm gan B, C ảnh hưởng rất nhiều đến sức khỏe của họ cũng như việc sắp xếp thời gian chờ ghép. Những người bệnh viêm gan B, C điều trị không ổn định sẽ lập tức bị đưa ra khỏi danh sách chờ ghép quốc gia cho đến khi họ được điều trị ổn định và sẵn sàng cho ca ghép thận. Vì vậy, việc quản lý người bệnh chạy TNT cũng như hạn chế tối đa nguồn lây nhiễm cho phép người bệnh có cơ hội tiếp cận với ghép thận nhiều hơn. 1/4 người bệnh đang chạy TNT mắc viêm gan C.

Bảng 2. Đặc điểm cận lâm sàng của người bệnh.

Đặc điểm (n=3.220)	Tần số (n)	Tỷ lệ (%)
Nhóm máu (n=1.125)		
A	231	20,53
B	341	30,31
O	487	43,29
AB	66	5,87
HBV (n=2.025)		
Có	183	9
Không	1.842	91
HCV (n=1.987)		
Có	506	25,5
Không	1.481	74,5
HIV (n=1.877)		
Có	0	0
Không	1.877	100
Siêu âm (n=844)		
Có	494	58,53
Không	350	41,47
XQ (n=844)		
Có	580	68,72
Không	264	31,28
CT (n=844)		
Có	112	13,27
Không	732	86,73
MRI (n=851)		
Có	90	10,58
Không	761	89,42
Nội soi đại trực tràng (n=844)		
Có	78	9,24
Không	766	90,76

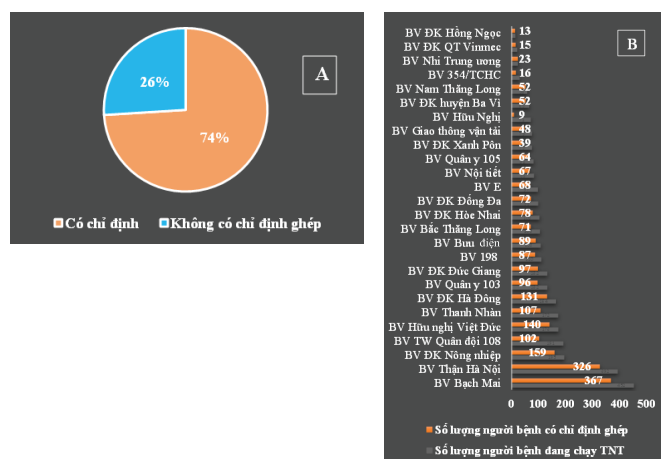
Chưa ghi nhận người bệnh nhiễm HIV trong nghiên cứu này. Một số nghiên cứu báo cáo nguy cơ suy thận giai đoạn cuối ở bệnh nhân nhiễm HIV cao hơn gấp 4 lần so với dân số chung. Ước tính khoảng 1,5% tổng số bệnh nhân thận giai đoạn cuối bị nhiễm HIV [14, 15]. Tại Việt Nam, người bệnh nhiễm HIV chưa có chỉ định ghép, nhưng trên thế giới việc lựa chọn người nhận và người cho phù hợp đã mang tới cơ hội cho người nhiễm HIV được ghép thận [16].

Trong số gần 850 người bệnh được thu thập dữ liệu về các xét nghiệm cận lâm sàng thì phần lớn người bệnh đều được chụp XQ, siêu âm tim, phổi hoặc ổ bụng nhằm sàng lọc các bệnh lý cơ bản. Tuy nhiên, các xét nghiệm chuyên sâu được thực hiện khá ít trên nhóm những người bệnh này. Tại Việt Nam, chỉ khi người bệnh có nhu cầu ghép thận, nghĩa là người bệnh đồng ý ghép khi có chỉ định ghép của bác sĩ thì khi đó họ sẽ được đánh giá chuyên sâu về các đặc điểm bệnh thận, cũng như đánh giá một cách tổng quát về tình trạng sức khỏe để sẵn sàng đưa vào danh sách chờ ghép quốc

gia. Đây cũng là lý do tại sao với 3.220 người bệnh đang chạy thận tại Hà Nội, nhưng số lượng người bệnh đã làm các xét nghiệm chuyên sâu như CT, MRI, nội soi dạ dày, trực tràng khá thấp.

Số lượng người bệnh có chỉ định ghép thận trong số người bệnh đang chạy TNT sau khi sàng lọc

Dựa trên các đặc điểm về tuổi, lâm sàng, cũng như cận lâm sàng, công tác sàng lọc nhóm người bệnh chạy TNT để lựa chọn người bệnh có chỉ định ghép thận là vô cùng quan trọng. Rất ít các nghiên cứu thống kê về số lượng người bệnh có chỉ định ghép cũng như có nhu cầu được ghép tại các cơ sở chạy TNT.



Hình 3. Số lượng người bệnh có chỉ định ghép thận.

Nhìn vào hình 3 ta thấy, trong nghiên cứu này, với tổng số 3.220 người bệnh đang chạy TNT, số lượng người bệnh được sàng lọc có chỉ định ghép là 2.383 (chiếm tỷ lệ 74%). Trong đó lượng người bệnh có chỉ định ghép thận đang điều trị tại Bệnh viện Bạch Mai và Bệnh viện Thận Hà Nội là cao nhất với số lượng người bệnh lần lượt là 367 và 326. Cơ sở của sự sàng lọc này dựa trên sự loại trừ các yếu tố thuộc chống chỉ định ghép thận như người bệnh có tiền sử phẫu thuật ung thư, có bệnh lý tim mạch phức tạp, các yếu tố về tiền sử bệnh và tuổi trên 65. Tuy nhiên, với các dữ liệu hiện có thì việc sàng lọc một cách tương đối đôi khi là khá khó khăn. Đây cũng là những thách thức cho người bệnh chạy TNT muốn tiếp cận đến ghép thận cũng như việc quản lý người bệnh chạy TNT trong quá trình chờ ghép. Việc cập nhật các chỉ số sức khỏe là vô cùng quan trọng để đánh giá người bệnh có đủ tiêu chuẩn ghép hay không. Nghiên cứu này chỉ dừng ở bước đánh giá một cách sơ bộ những người bệnh đang chạy TNT tại TP Hà Nội, đưa ra được số lượng người có chỉ định ghép và có những kế hoạch can thiệp đối với nhóm người bệnh này trong tiếp cận chờ ghép thận.

Kết luận

Qua nghiên cứu đặc điểm của người bệnh chạy TNT tại 26 bệnh viện trên địa bàn Hà Nội cho thấy, 74% người bệnh đang chạy TNT tại TP Hà Nội (tương đương với gần 2.400 người) có chỉ định ghép thận; tuổi trung bình của người bệnh có chỉ định ghép thận là gần 49 tuổi, trong đó nam (55%) nhiều hơn nữ (45%), thời gian chạy thận dưới 5 năm chiếm tỷ lệ cao nhất (43%), 25% người

bệnh có chỉ định ghép thận có HCV dương tính; suy thận mạn do viêm cầu thận mạn và tăng huyết áp, tiểu đường là 2 nhóm nguyên nhân chính chiếm đến 94% số người bệnh đang chạy thận có chỉ định ghép.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện trong khuôn khổ đề tài “Nghiên cứu xây dựng và áp dụng quy trình điều phối ghép tạng tại Việt Nam” (mã số KC.10.38/16-20). Các tác giả xin chân thành cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ đã cấp kinh phí để thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] M. Carmona, et al. (2017), “Global organ transplant activities in 2015. Data from the global observatory on donation and transplantation (GODT)”, *Transplantation*, **101**, DOI: 10.1097/01.tp.0000525015.43613.75.
- [2] M. Hatzinger, et al. (2016), “The history of kidney transplantation”, *Urologic A*, **55**, pp.1353-1359.
- [3] B. Pham Van, C. Vo Duc (2020), “Global dialysis perspective: Vietnam”, *Kidney360*, **1(9)**, pp.974-976.
- [4] J. Himmelfarb, et al. (2020), “The current and future landscape of dialysis”, *Nature Reviews Nephrology*, **16**, pp.573-585.
- [5] C.M. Duong, et al. (2015), “Challenges of hemodialysis in Vietnam: experience from the first standardized district dialysis unit in Ho Chi Minh City”, *BMC Nephrology*, **16**, p.122.
- [6] R. Oluyombo, et al. (2014), “Challenges of hemodialysis in a new renal care center: call for sustainability and improved outcome”, *Int. J. Nephrol. Renovasc Dis.*, **7**, pp.347-352.
- [7] M. Polikandrioti, et al. (2017), “Hemodialysis patients’ information and associated characteristics”, *Mater. Sociomed*, **29**, pp.182-187.
- [8] D. Khulia, et al. (2016), “Needs of hemodialysis patients and factors affecting them”, *Glob. J. Health Sci.*, **8**, pp.109-120.
- [9] M. Veroux, et al. (2012), “Age is an important predictor of kidney transplantation outcome”, *Nephrol. Dial. Transplant.*, **27**, pp.1663-1671.
- [10] D. Akolekar, et al. (2013), “Impact of patient characteristics and comorbidity profile on activation of patients on the kidney transplantation waiting list”, *Transplant. Proc.*, **45**, pp.2115-2122.
- [11] T. Schachtner, et al. (2018), “Two decades of Eurotransplant senior program (ESP): time on dialysis independently impacts patient survival, allograft survival and quality of life after kidney transplantation”, *Transplant.*, **102**, p.34.
- [12] J.L. Wainright, et al. (2017), “The impact of the New Kidney allocation system on prior living kidney donors’ access to deceased donor kidney transplants: an early look”, *Am. J. Transplant.*, **17**, pp.1103-1111.
- [13] S. Lee, et al. (2019), “Factors affecting mortality during the waiting time for kidney transplantation: a nationwide population-based cohort study using the Korean Network for Organ Sharing (KONOS) database”, *PLOS ONE*, **14**, p.0212748.
- [14] M.G. Rasch, et al. (2014), “Increased risk of dialysis and end-stage renal disease among HIV patients in Denmark compared with the background population”, *Nephrol. Dial. Transplant.*, **29(6)**, pp.1232-1238.
- [15] J.C. Trullàs, et al. (2008), “Prevalence and clinical characteristics of HIV type 1-infected patients receiving dialysis in Spain: results of a Spanish survey in 2006: GESIDA 48/05 study”, *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **24**, pp.1229-1235.
- [16] X. Zheng, et al. (2019), “Kidney transplant outcomes in HIV-positive patients: a systematic review and meta-analysis”, *AIDS Research and Therapy*, **16**, p.37.

Khảo sát khả năng kháng ung thư *in vitro* của doxorubicin bao trong hạt nano oxy hóa khử nhạy pH

Nguyễn Thị Hoàng¹, Trịnh Như Thùy², Vòng Bính Long^{2*}

¹Khoa Sinh học - Công nghệ sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên,
Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

²Khoa Kỹ thuật Y sinh, Trường Đại học Quốc tế, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 8/3/2021; ngày chuyển phản biện 10/3/2021; ngày nhận phản biện 12/4/2021; ngày chấp nhận đăng 19/4/2021

Tóm tắt:

Doxorubicin (DOX) được biết đến là một tác nhân hóa trị liệu nhiều loại ung thư. Tuy nhiên, DOX bị hạn chế trong các ứng dụng lâm sàng do tác dụng phụ nghiêm trọng gây ra bởi việc phân bố không đặc hiệu dẫn đến hiệu quả điều trị thấp. Trong nghiên cứu này, hạt nano oxy hóa khử nhạy pH axit chứa DOX được nghiên cứu nhằm tạo thành hạt nano bao thuốc có kích thước khoảng 40-60 nm làm tăng nồng độ thuốc tích lũy ở vị trí khối u khi đáp ứng với môi trường pH thấp. Các đặc tính tối ưu của hạt nano được khảo sát bằng các phân tích về khả năng kháng oxy hóa, nhạy với pH, khả năng giải phóng thuốc trong môi trường pH thấp và thử nghiệm độc tính trên tế bào ung thư, quan sát khả năng ức chế sự di căn của thuốc bao nano. Kết quả cho thấy, sự kết hợp DOX với hạt nano oxy hóa khử nhạy pH này không những làm tăng khả năng kháng ung thư trên dòng tế bào ung thư đại trực tràng (C-26), ung thư vú (MCF-7) mà còn làm giảm độc tính trên tế bào nội mô (BAEC), ức chế sự di chuyển của tế bào C-26 *in vitro*. Từ những kết quả trong nghiên cứu này cho thấy tiềm năng ứng dụng của hạt nano oxy hóa khử nhạy pH trong việc cải thiện hiệu quả điều trị ung thư.

Từ khóa: doxorubicin, hệ thống phân phối thuốc, oxy hóa, stress, ung thư, y học nano.

Chỉ số phân loại: 3.4

Giới thiệu

Ung thư là một nhóm bệnh do các tế bào phát triển bất bình thường, mất kiểm soát, có khả năng xâm lấn và làm hại các mô khỏe mạnh, chúng có thể di chuyển đến một số cơ quan quan trọng như gan, não, phổi, tim, khiến bệnh nhân suy đa cơ quan và tử vong [1, 2]. Nguyên nhân gây ung thư có thể do sự biến đổi các yếu tố di truyền hoặc bị tác động bởi các tác nhân bên ngoài như bức xạ tia cực tím và ion hóa (tác nhân vật lý), khói thuốc lá, chất gây ô nhiễm thực phẩm, ô nhiễm môi trường (tác nhân hóa học), nhiễm trùng từ một số loại virus, ký sinh trùng (tác nhân sinh học) [3]. Ngoài ra, mức độ ROS (gốc oxy hóa khử mạnh, reactive oxygen species) trong mô cũng được xem là dấu hiệu bệnh lý ung thư. Trong tế bào ung thư, ROS được chứng minh hiện diện với nồng độ cao hơn so với tế bào thường. Chúng đóng vai trò như phân tử tín hiệu, góp phần thúc đẩy các tế bào ung thư tăng sinh mất kiểm soát, tăng sinh mạch, xâm lấn, di căn và trốn thoát chương trình tự chết của tế bào (apoptosis). Do đó, ROS trở thành mục tiêu tiềm năng cho các liệu pháp điều trị ung thư [4].

Hóa trị là một hình thức điều trị ung thư truyền thống

khá phổ biến, sử dụng thuốc để tiêu diệt các tế bào phát triển và tăng sinh nhanh chóng, là đặc tính quan trọng của tế bào ung thư [5, 6]. Doxorubicin (DOX) là thuốc hóa trị liệu của nhiều loại ung thư, được chuyển hóa từ xạ khuẩn *Streptomyces peucetius* [7]. DOX kháng tế bào ung thư bằng cách xâm nhập vào DNA tế bào, ngăn chặn hoạt động enzyme sao chép topoisomerase II hoặc hình thành các gốc tự do ROS để tiêu diệt tế bào ung thư [8]. DOX tan trong nước nên sau khi tiêm tĩnh mạch, các phân tử thuốc khuếch tán và phân phối tự do khắp cơ thể, dẫn đến tác dụng phụ không mong muốn và hạn chế đạt liều lượng thích hợp cần thiết để ức chế tế bào ung thư.

Công nghệ nano là một lĩnh vực khoa học mới đang phát triển nhanh chóng trong thế kỷ XXI và được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực như công nghiệp, nông nghiệp, y học, mỹ phẩm... [9, 10]. Các vật liệu có kích thước từ 10-100 nm như hạt nano tương thích sinh học, nano robot cho thấy hiệu quả rất cao trong việc chẩn đoán, phân phối thuốc trúng đích... [11, 12]. Một trong những ứng dụng được nghiên cứu nhiều nhất về công nghệ nano là thiết kế các vật liệu có kích thước nano làm hệ thống phân phối thuốc đến

*Tác giả liên hệ: Email: vblong@hcmiu.edu.vn

Studying the anticancer activity *in vitro* of doxorubicin-encapsulated pH-sensitive redox nanoparticles

Thi Hoang Nguyen¹, Nhu Thuy Trinh², Binh Long Vong^{2*}

¹Faculty of Biology and Biotechnology, University of Science, Vietnam National University Ho Chi Minh city (VNU-HCMC)

²School of Biomedical Engineering, International University, VNU-HCMC

Received 8 March 2021; accepted 19 April 2021

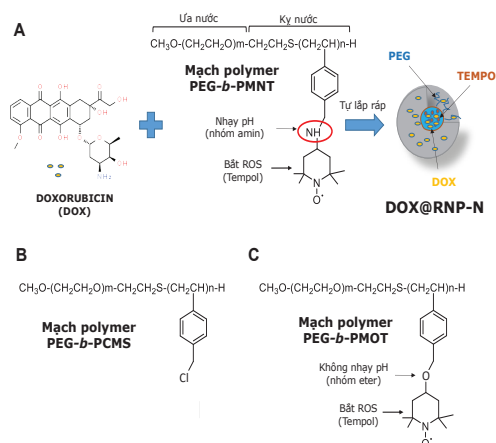
Abstract:

Doxorubicin (DOX) is known as a chemotherapeutic agent for treating a variety of cancers. However, due to non-specific distribution, DOX causes severe side effects, leading to the limitation of its clinical application. In this study, pH-sensitive redox nanoparticles containing DOX were studied to form drug-coated nanoparticles with the size of about 40-60 nm that increases the concentration of drugs accumulated at the tumor site in response to low pH conditions. The optimal properties of the nanoparticles were investigated by analysing the antioxidant activity, sensitivity to pH, drug delivery in a low pH environment, and toxicity on cancer cells, thereby observing the possibility of inhibiting the migration of cancer cells. Results showed that the combination of DOX and the pH-sensitive redox nanoparticles not only increases anticancer in colorectal cancer (C-26), breast cancer (MCF-7) but also reduces bovine aorta endothelial cells (BAEC) and inhibits C-26 cell migration *in vitro*. The paper results reveal the application potential of the pH-sensitive redox nanoparticles in improving the effectiveness of cancer treatment.

Keywords: cancer, doxorubicin, drug delivery system, nanomedicine, oxidizing, stress.

Classification number: 3.4

vị trí mục tiêu, giúp tiêu diệt tế bào ung thư mà không ảnh hưởng đến tế bào thường. Hệ thống thuốc nano cải thiện thời gian hấp thu thuốc, giúp các thuốc tan trong nước giải phóng thuốc chậm hơn, giữ hàm lượng thuốc ổn định trong khoảng thời gian tối đa và tối thiểu mong muốn. Một số dạng hạt nano thường được ứng dụng làm hệ thống phân phối thuốc như nano polymer, liposome, dendrimer, nanoshell... [13], trong đó nano polymer là một trong những hệ thống phân phối thuốc tiềm năng nhất bởi khả năng phân hủy và tương hợp sinh học [14, 15]. Trong nghiên cứu này, hạt nano oxy hóa khử (redox nanoparticle - RNP) là một loại nano polymer được tạo từ khối polymer lưỡng tính poly(ethylene glycol)-b-poly(4-(2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl) aminomethylstyrene (PEG-b-PMNT) bằng phương pháp thẩm tích loại dung môi. Khối polymer đồng trùng hợp này sau khi hòa tan trong nước sẽ xảy ra hiện tượng tái sắp xếp cấu trúc giữa các phân đoạn ưa nước và kỵ nước thành những khối cầu micell trong nước. Trong khối cầu này, các phân đoạn kỵ nước sẽ tập trung tạo thành lõi được bao bọc bởi vỏ hình thành từ những phân đoạn ưa nước [16] như được mô tả ở hình 1. Hạt nano này gồm mạch ưa nước PEG và mạch kỵ nước PMNT có chứa gốc nitroxide TEMPO có khả năng kháng oxy hóa [17]. Bên cạnh đó, hạt nano thể hiện tính nhạy với pH axit vì gốc nitroxide TEMPO liên kết trong mạch PMNT với liên kết amine, là một liên kết dễ dàng bị proton hóa trong điều kiện axit [17], dẫn đến sự không kém bền của hạt nano RNP-N ở pH thấp như ở môi trường vi khối u. Lớp phủ PEG làm cho hạt nano trở nên ưa nước và trung tính hơn, cho phép chúng dễ dàng vượt qua hệ thống miễn dịch, tăng thời gian bán hủy và lưu thông trong máu [18]. Ngoài ra, nhằm mục tiêu thụ động là quá trình các hạt nano thoát ra khỏi vòng tuần hoàn qua hệ mạch bị rò rỉ đến vùng khối u [19], đây là hiện tượng hiệu ứng tăng tính thấm và tính lưu (Enhanced Permeability and Retention effect) [20]. Khai thác các đặc điểm sinh học đặc trưng của môi trường khối u như có độ pH axit so với pH máu, nồng độ ROS cao, khả năng thấm và lưu giữ các vật liệu kích thước nhỏ hơn 1.000 nm, hạt nano oxy hóa khử nhạy pH mang thuốc DOX đến mục tiêu khối u nhằm tăng hiệu quả dược chất và giảm tác dụng phụ. Mục tiêu của nghiên cứu này là khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa của hạt nano nhạy pH (RNP-N) và hoạt tính kháng ung thư sau khi mang thuốc DOX trên mô hình tế bào *in vitro*. Hạt nano oxy hóa khử không nhạy với pH (RNP-O) [21] và hạt nano không có khả năng kháng oxy hóa (nRNP) [17] là những hạt nano được sử dụng thực hiện các khảo sát đối chứng dùng trong nghiên cứu này.



Hình 1. Cấu trúc mạch polymer tổng hợp nano dùng trong nghiên cứu này. (A) Mạch polymer PEG-*b*-PMNT và hạt nano nhạy pH bao thuốc doxorubicin (DOX@RNP-N). (B) Mạch polymer PEG-*b*-PCMS không chứa gốc kháng oxy hoá Tempo. (C) Mạch polymer PEG-*b*-PMOT chứa gốc kháng oxy hoá Tempo tạo liên kết ether không nhạy pH.

Vật liệu và phương pháp

Hóa chất

Các polymer bao gồm poly(ethylene glycol)-*b*-poly[4-(2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl)aminomethylstyrene] PEG-*b*-PMNT, mạch polymer PEG-*b*-PCMS, mạch polymer poly(ethylene glycol)-*b*-poly[4-(2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl)oxymethylstyrene] PEG-*b*-PMOT được tổng hợp bằng phương pháp polymer hoá tự do theo nghiên cứu trước đây [17, 21]. Trước tiên, mạch PEG-*b*-PCMS được tổng hợp bằng phương pháp polymer hoá tạo gốc tự do dùng PEG và chloromethyl styrene với chất xúc tác azobisisobutyronitrile. Sau đó, gốc nitride của amino-tempo hoặc hydroxyl-tempo được gắn vào mạch PEG-*b*-PCMS tạo liên kết amine hoặc eter. Các hoá chất bao gồm doxorubicin (DOX), dimethylformamide (DMF), 4-amino-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (amino-tempo) được mua từ Công ty Wako, Nhật Bản. Môi trường nuôi tế bào Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mua từ Công ty Gibco, Mỹ được pha với 5% huyết thanh nhau thai bò (fetal bovine serum (FBS) và 1% kháng sinh penicillin, streptomycin, neomycin từ Công ty Sigma, Mỹ, được khử trùng bằng màng lọc 0,22 μ m. Các hoá chất khác như 2,2-diphenyl-1-(2,4,6 trinitrophenyl) hydrazyl (DPPH), 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) được mua từ Sigma, Mỹ. Các dung dịch đệm phosphate được pha với NaCl (137 mM), KCl (2,7 mM), Na_2HPO_4 (10 mM) và KH_2PO_4 (1,8 mM), sau đó pH được chỉnh bằng NaOH (1 M) hoặc HCl (1 M). Nước cất 2 lần được sử dụng trong suốt quá trình thí nghiệm.

Tế bào

Tế bào nội mô động mạch bò (BAEC), tế bào ung thư đại trực tràng chuột (C-26) và tế bào ung thư vú ở người (MCF-7) được mua từ RIKEN BioResource Research Center, Nhật Bản.

Quy trình tạo hạt nano và hạt nano bao thuốc

Tạo hạt nano: hạt nano RNP-N tạo ra từ mạch polymer PEG-*b*-PMNT bằng phương pháp thẩm tích loại dung môi. Đầu tiên, hòa tan 15 mg PEG-*b*-PMNT trong 1 ml *N,N*-dimethylformamide (DMF), khuấy từ 15 phút để hòa tan hoàn toàn, sau đó chuyển hỗn hợp dung dịch vào màng thẩm tích (MWCO = 3,5 kDa từ Công ty Spectrum Laboratories) tiến hành thẩm tích trong 24 giờ với 2 lít nước cất, thay nước 4 lần. Hạt nano đối chứng là RNP-O (từ mạch PEG-*b*-PMOT) và nRNP (từ mạch PEG-*b*-PCMS) thực hiện tương tự như trên.

Tạo hạt nano bao thuốc: hòa tan hỗn hợp thuốc DOX và mạch polymer với tỷ lệ 1:20 trong dung dịch DMF, khuấy từ 15 phút để hòa tan hoàn toàn. Sau đó, chuyển hỗn hợp dung dịch này vào màng thẩm tích kích thước MWCO = 3,5 kDa, thẩm tích trong 24 giờ và khoảng 4 giờ sẽ thay nước 1 lần.

Phương pháp bắt gốc tự do DPPH

Khảo sát khả năng kháng oxy hóa của hạt nano: dung dịch DPPH 40 μ g/ml: hòa tan 4 mg trong 100 ml dung dịch methanol (chú ý tránh sáng). Pha các mẫu thử (RNP-N, RNP-O, nRNP, Tempol) với dung dịch đệm photphat pH 7,4 thành các nồng độ khác nhau (0, 20, 50, 80, 100 μ g/ml). Trộn 1 ml mẫu thử với 1,5 ml dung dịch DPPH (tỷ lệ 2:3) và để phản ứng xảy ra 30 phút trong tối. Đo giá trị OD ở bước sóng 517 nm bằng máy quang phổ kế UV-Vis.

Khảo sát sự ảnh hưởng của pH đến khả năng kháng oxy hóa: cách tiến hành tương tự như thí nghiệm khảo sát khả năng kháng oxy hóa của hạt nano nhưng thử nghiệm với 3 mẫu thử (RNP-N, RNP-O, nRNP) trong hai dung dịch đệm phosphate có pH 7,4 và đệm phosphate có pH 5,5.

Phương pháp tán xạ ánh sáng động

Đo kích thước hạt: kích thước hạt nano và độ phân bố hạt (PdI) được xác định bằng thiết bị đo kích thước hạt Zetasizer Nano ZS (Malvern, Anh) ở 25°C, với góc tán xạ là 173°. Mẫu được pha loãng với nước cất hoặc dung dịch đệm phosphate có pH 7,4 trước khi đo.

Khảo sát độ nhạy với pH axit: pha loãng mẫu thử (RNP-N, RNP-O) với dung dịch đệm phosphate (PBS 7,4, PBS 5,5, PBS 2,0) theo tỷ lệ 1:2. Tiến hành xác định tốc độ đếm của hỗn hợp nano với PBS 7,4. Cố định vị trí ánh sáng phát ra và quan sát sự thay đổi tốc độ đếm của các hỗn hợp còn lại sau 10 phút ở các pH khác nhau.

Khảo sát sự giải phóng DOX

Cho 3 ml dung dịch mẫu thử gồm DOX và DOX@RNP-N vào màng thấm tích kích thước MWCO 3,5 kDa. Tiếp đó, cho màng thấm tích vào 400 ml dung dịch đệm phosphate (PBS 7,4, PBS 5,5). Xác định mật độ quang của 100 µl dịch mẫu ở bước sóng 490 nm bằng thiết bị đo mật độ quang 96 giếng PerkinElmer tại các thời điểm 0 phút, 30 phút, 1 giờ, 3 giờ, 6 giờ, 8 giờ, 20 giờ và 24 giờ.

Khảo sát độc tính tế bào bằng phương pháp MTT

Cho 180 µl dịch tế bào (C-26, MCF-7, BAEC) vào đĩa 96 giếng với mật độ khoảng 10^4 tế bào/giếng, ủ ở điều kiện 37°C, 5% CO₂ trong 24 giờ. Thêm 20 µl mẫu thử DOX, DOX@RNP-N, RNP-N vào mỗi giếng với nồng độ DOX lần lượt là 0,03125; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1 (µg/ml), ủ ở 37°C, 5% CO₂ trong 48 giờ. Loại bỏ dịch môi trường và thêm 50 µl dung dịch MTT (0,5 mg/ml PBS), ủ tiếp trong 4 giờ. Loại bỏ MTT và thêm 100 µl dung dịch DMSO, ủ tiếp trong 10 phút và huyền phù để hòa tan hoàn toàn formazan. Tiến hành đo mật độ quang ở bước sóng 540 nm bằng máy đọc đĩa 96 giếng (PerkinElmer).

Hiệu quả kháng ung thư của DOX kết hợp với nano được xác định bằng phần trăm sống sót của tế bào theo công thức sau:

$$\% \text{ tế bào sống sót} = \frac{OD_{\text{mẫu}} - OD_{\text{blank}}}{OD_{\text{mẫu đối chứng}} - OD_{\text{blank}}} \times 100\%$$

Trong đó: OD_{mẫu} là chỉ số mật độ quang của tế bào xử lý với hạt nano và DOX; OD_{blank} là chỉ số mật độ quang của mẫu dung dịch môi trường không có tế bào; OD_{mẫu đối chứng} là chỉ số mật độ quang của mẫu tế bào xử lý với PBS.

Phương pháp tạo ức chế tế bào di căn

Cho 500 µl dịch tế bào C-26 vào đĩa 24 giếng với mật độ khoảng 10^5 tế bào/giếng và ủ ở điều kiện 37°C, 5% CO₂ trong 48 giờ. Hút bỏ môi trường, tạo vết rạch bằng đầu tip 200 µl. Rửa bỏ tế bào trôi bằng 200 µl dung dịch PBS. Bổ sung 450 µl môi trường DMEM có 5% FBS, 1% kháng sinh và 50 µl mẫu thử (DOX, DOX@RNP-N, RNP-N) vào mỗi giếng, lắc nhẹ. Các mẫu thử nghiệm khảo sát với nồng độ DOX là 0,5 µg/ml. Quan sát và đo khoảng cách vết rạch ở thời điểm 24 giờ.

Khả năng ức chế tế bào di chuyển của nano bao thuốc DOX được tính theo công thức sau:

$$\% \text{ tế bào di chuyển (\%)} = \frac{\text{Khoảng cách di chuyển ở 24 giờ}}{\text{Khoảng cách tế bào ở 0 giờ}} \times 100$$

$$\% \text{ ức chế tế bào di chuyển (\%)} = 100\% - \% \text{ tế bào di chuyển}$$

Xử lý thống kê

Tất cả số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Office Excel 2016 dưới dạng trung bình $\pm$ SD. Sử dụng Student's *t*-test để đánh giá sự khác biệt thống kê giữa các kết quả, với độ lặp lại 3 lần. Sự khác biệt giữa hai nhóm có ý nghĩa khi **p*<0,05 hoặc ***p*<0,01.

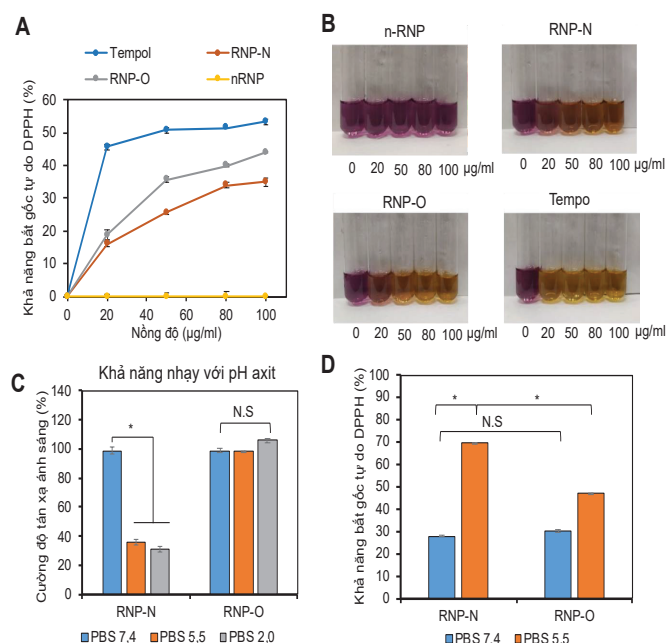
Kết quả và thảo luận

Phân tích các đặc tính hạt nano

Mẫu dung dịch nano thu từ quá trình thẩm tích loại dung môi được tiến hành phân tích các đặc tính gồm khả năng kháng oxy hóa bằng phương pháp bắt gốc tự do DPPH và khả năng nhạy với pH axit bằng phương pháp tán xạ ánh sáng động DLS. Hình 2A và hình 2B cho thấy hạt nano RNP-N và RNP-O có khả năng kháng oxy hóa so với Tempo - chất được chứng minh là một trong những chất có khả năng kháng oxy hóa mạnh và hạt nRNP không có khả năng kháng oxy hóa. Tại nồng độ 100 µg/ml, hoạt tính kháng oxy hóa của RNP-N đạt được khoảng 30%, RNP-O 40% và Tempo 50%. Mạch polymer PEG-*b*-PMNT có chứa nhóm nitroxide có khả năng bắt gốc tự do nhưng chúng bị gấp cuộn lại để hình thành lõi hạt nano nên khả năng bắt gốc tự do của nhóm nano thấp hơn so với Tempo.

Khả năng nhạy với pH axit của hạt nano được thể hiện ở hình 2C. Khi vị trí ánh sáng laser được cố định ở một vị trí nhất định, cường độ tán xạ của hạt nano tỷ lệ thuận với số lượng hạt hấp thụ. Ở các điều kiện pH giảm dần từ trung tính đến axit (pH 7,4 đến pH 2,0), cường độ tán xạ của hạt nano RNP-N liên tục giảm từ 100 xuống 30%, trong khi đó đại lượng này hầu như không đổi đối với hạt nano RNP-O. Nhánh kỵ nước PMNT của mạch polymer PEG-*b*-PMNT có chứa nhóm amino dễ dàng bị proton hóa ở điều kiện axit, trong khi đó nhánh PMOT chứa gốc eter ổn định ở điều kiện axit. Do đó, chúng tôi hạt nano RNP-N nhạy trong môi trường axit, dẫn đến cấu trúc lỏng lẻo, sự tách rời của các mạch polymer và không giữ lại cấu trúc nano.

Tiến hành đánh giá khả năng kháng oxy hóa của hạt nano trong 2 điều kiện môi trường trung tính (pH 7,4) và môi trường axit (pH 5,5) bằng phương pháp bắt gốc tự do DPPH cho thấy: trong điều kiện trung tính (pH 7,4), hoạt tính kháng oxy hóa của hạt nano nhạy với pH axit RNP-N và hạt nano không nhạy RNP-O không có nhiều sự khác biệt, cụ thể RNP-N đạt 27,85% và RNP-O đạt 30,04%. Tuy nhiên, trong điều kiện pH 5,5 hoạt tính kháng oxy hóa của RNP-N đạt 60,45%, cao gấp 1,5 lần so với RNP-O chỉ đạt 46,86% (hình 2D). Điều này chứng minh cấu trúc hạt nano RNP-N kém bền trong môi trường axit so với hạt nano RNP-O, biểu lộ các nhóm Tempo trong mạch polymer làm tăng hoạt tính kháng oxy hoá của hạt nano.



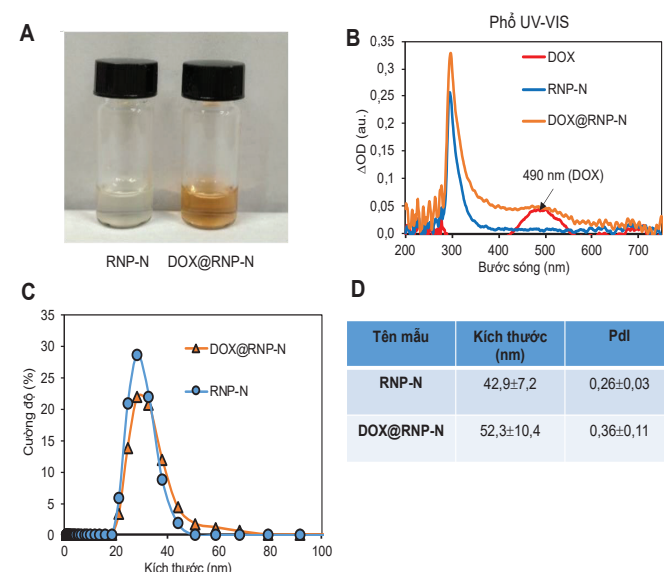
Hình 2. Đặc tính kháng oxy hóa và nhạy pH của hạt nano RNP-N. (A, B) Khả năng kháng oxy hóa của hạt nano: RNP-N (màu cam), RNP-O (màu xám) thể hiện khả năng kháng oxy hóa so với Tempol (màu xanh dương) kháng oxy hóa mạnh và nRNP (màu vàng) không có khả năng kháng oxy hóa. (C) Khả năng nhạy với pH axit của hạt nano: cường độ tán xạ ánh sáng của hạt nano RNP-N giảm dần theo chiều giảm dần của giá trị pH dung dịch đệm PBS 7,4 (màu xanh dương), PBS 5,5 (màu cam) và PBS 2,0 (màu xám), trong khi cường độ tán xạ của RNP-O không thay đổi ở cả 3 giá trị pH. (D) Sự ảnh hưởng của pH đến khả năng kháng oxy hóa của hạt nano: phần trăm bắt gốc tự do DPPH của RNP-N (nhạy với pH axit) và RNP-O (không nhạy với pH axit) không có sự khác biệt ở giá trị PBS 7,4 (xanh dương) nhưng chênh lệch nhiều ở dung dịch PBS 5,5 (màu cam) với * $p < 0,05$, N.S: không có sự khác biệt thống kê.

Phân tích các đặc tính của hạt nano bao thuốc

Quan sát mẫu dung dịch nano bao thuốc sau thẩm tích (DOX@RNP-N) có màu đỏ nhạt so với màu hơi vàng của mẫu dung dịch nano RNP-N (hình 3A), tức DOX đã được bao trong lõi hạt nano. Mặt khác, hạt nano bao thuốc xuất hiện đỉnh hấp thụ tại bước sóng 490 nm, là bước sóng hấp thụ cực đại của thuốc DOX, trong khi đó hạt nano RNP-N không hấp thụ tại bước sóng này (hình 3B). Điều này chứng tỏ các hạt nano không ảnh hưởng đến độ hấp thụ của DOX và DOX có chứa trong lõi hạt nano. Khi quan sát kích thước thì hạt nano bao thuốc (DOX@RNP-N) có kích thước tăng so với kích thước của hạt nano (RNP-N) (hình 3C và D). Cụ thể, kích thước của RNP-N là $42,9 \pm 7,2$ nm thì sau khi bao thuốc kích thước hạt đạt $52,3 \pm 10,4$ nm (DOX@RNP-N). Với khoảng kích thước này, các hạt nano sẽ thuận lợi mang thuốc DOX thụ động đến vị trí khối u nhờ hiệu ứng tăng tính thấm và tính lưu [22].

Để xác định chính xác nồng độ thuốc được bao, tiến hành định lượng bằng phương pháp khảo sát khả năng bao thuốc (Drug Loading Capacity) và hiệu suất bao thuốc

(Efficiency Encapsulation) của hạt nano. Dựa vào giá trị OD của DOX@RNP-N và đồ thị đường chuẩn, xác định hạt nano RNP-N bao thành công 30,18% thuốc DOX với khả năng bao thuốc là 1,51%.

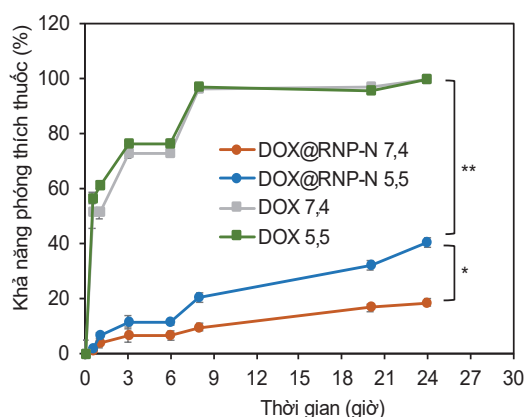


Hình 3. Đặc tính của hạt nano bao thuốc (DOX@RNP-N). (A) Dung dịch nano RNP-N và DOX@RNP-N, màu sắc của hạt nano trước và sau khi bao thuốc có sự khác biệt rõ rệt. (B) Phổ hấp thụ UV-Vis của hạt nano. DOX@RNP-N (màu cam) xuất hiện đỉnh hấp thụ ở bước sóng 490 nm, là bước sóng hấp thụ cực đại của DOX (màu đỏ), trong khi đó RNP-N (màu xanh dương) hầu như không hấp thụ ở bước sóng này. (C và D) Sự thay đổi kích thước trước và sau khi bao thuốc bằng phương pháp tán xạ ánh sáng động (DLS).

Sự giải phóng DOX của hạt nano

Sự giải phóng DOX của hạt nano bao thuốc (DOX@RNP-N) được khảo sát ở điều kiện 37°C với hai giá trị pH khác nhau, pH 7,4 (tương trưng cho môi trường máu và sinh lý bình thường) và pH 5,5 (tương trưng môi trường vi mô khối u) (hình 4). Ở điều kiện pH 7,4, lượng thuốc giải phóng ra khỏi hạt nano RNP-N khá thấp, cụ thể sau 24 giờ khảo sát chỉ có khoảng 19% lượng thuốc DOX được giải phóng (hình 4). Còn ở giá trị pH 5,5, lượng thuốc DOX giải phóng nhanh hơn do RNP-N phân rã trong điều kiện axit, với khoảng 18 và 40% lượng thuốc lần lượt được giải phóng sau 6 giờ và 24 giờ khảo sát. Với ưu điểm kích thước nhỏ khoảng 40-60 nm, DOX@RNP-N có thể di chuyển đến các vị trí vùng mô khối u thông qua hiệu ứng tăng tính thấm và tính lưu. Mặt khác, khi so sánh sự giải phóng của hai dung dịch DOX và DOX@RNP-N (hình 4) đã cho thấy khả năng thuốc DOX giải phóng ra ngoài được kiểm soát khi bao trong hạt nano oxy hóa khử nhạy pH. Điều này chứng tỏ hạt nano RNP-N đã kéo dài thời gian lưu thông trong máu của thuốc DOX, phù hợp ứng dụng trong điều trị ung thư. Do đó, với những đặc tính tối ưu này của hạt nano RNP-N và DOX@RNP-N, chúng được lựa chọn để thực hiện khảo sát tiếp ở những thí

nghiệm xác định hoạt tính kháng ung thư như độc tính trên tế bào và ức chế sự di căn của tế bào.



Hình 4. Sự giải phóng DOX ở những điều kiện pH khác nhau. So sánh sự giải phóng thuốc của DOX và DOX@RNP-N ở điều kiện pH 7,4 (môi trường sinh lý bình thường) và pH 5,5 (môi trường vi mô khối u). Hạt nano RNP-N có khả năng kiểm soát lượng DOX giải phóng ra ngoài môi trường. Các số liệu được trình bày dưới dạng trung bình $\pm$ SD và * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

RNP-N tăng cường khả năng kháng ung thư của DOX

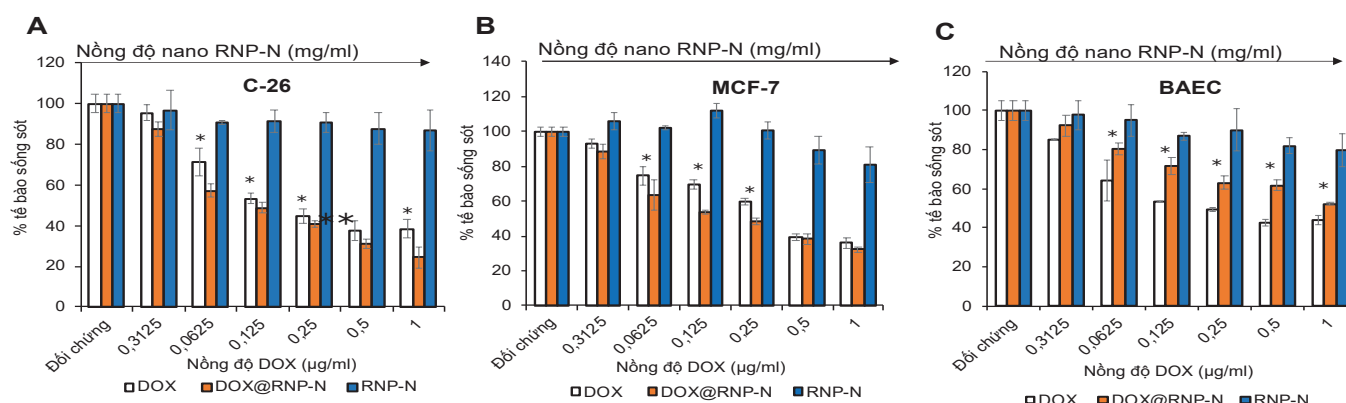
Hiệu quả kháng ung thư *in vitro* của DOX, DOX@RNP-N, RNP-N trên dòng tế bào ung thư đại trực tràng C-26 và ung thư vú MCF-7 được thực hiện bằng phương pháp độc tính trên tế bào MTT. Hạt nano RNP-N không gây độc tính trên tế bào ung thư và điều này cũng đã được chứng minh trong một số nghiên cứu trước đó [23]. RNP-N cải thiện hiệu quả kháng ung thư của DOX trên cả dòng tế bào ung thư đại trực tràng C-26 và ung thư vú MCF-7 với nồng độ thuốc càng cao thì số lượng tế bào ung thư sống sót càng thấp (hình 5A và B). Ở nồng độ khảo sát cao nhất 1 $\mu\text{g/ml}$, sau 48 giờ chỉ còn 20% tế bào C-26 còn sống khi điều trị bởi DOX@RNP-N, trong khi đó 40% tế bào C-26 còn sống khi thử nghiệm bởi DOX. Tình trạng tương tự cũng xảy ra với điều trị ở tế bào MCF-7 (hình 5B). Kết quả cho thấy RNP-N

tăng hiệu quả điều trị của thuốc DOX trong sự ức chế phát triển của các dòng tế bào ung thư.

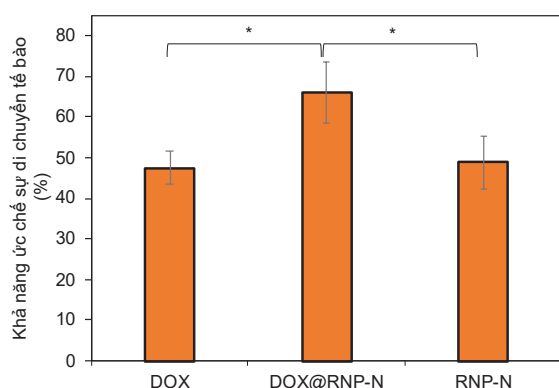
Ngoài ra, tác động của DOX@RNP-N đến sự sống sót của tế bào thường BAEC cũng được đánh giá. Kết quả cho thấy RNP-N làm giảm độc tính của DOX trên dòng tế bào nội mô bình thường BAEC (hình 5C). Sau 48 giờ khảo sát có 40% tế bào sống sót khi điều trị bởi DOX 0,25 $\mu\text{g/ml}$, trong khi có khoảng 62% tế bào sống sót khi điều trị bằng DOX@RNP-N cùng nồng độ DOX. Hạt nano RNP-N có khả năng kháng oxy hóa, chẹn bắt ROS được tạo ra bởi thuốc DOX trên tế bào thường, làm cân bằng tỷ lệ chất kháng oxy hóa và gốc oxy hóa mạnh ROS trong cơ thể, giảm độc tính do DNA không bị tổn thương bởi stress oxy hóa [19]. Hạt nano RNP-N có tiềm năng ứng dụng trong việc tăng hiệu quả kháng ung thư và làm giảm tác dụng phụ của thuốc hóa trị lên mô tế bào khỏe mạnh.

Khả năng ức chế sự di chuyển của tế bào ung thư đại trực tràng C-26

Khảo sát khả năng ức chế sự di chuyển tế bào bằng thuốc hóa trị DOX, DOX@RNP-N và hạt nano RNP-N. DOX@RNP-N cho thấy có sự ức chế di chuyển của tế bào ung thư đại trực tràng C-26 cao hơn so với DOX ở cùng nồng độ khảo sát là 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (hình 6). Sau 24 giờ thử nghiệm trên dòng tế bào ung thư đại trực tràng, DOX@RNP-N ức chế sự di chuyển của khoảng 66% tế bào, trong khi DOX ức chế khoảng 49% tế bào. Điều này có thể là do bản chất RNP-N cũng có khả năng ức chế sự di chuyển tế bào và trong cùng một thời gian khảo sát, RNP-N ức chế khoảng 45% tế bào. Do đó, sự kết hợp DOX với hạt nano oxy hóa RNP-N ức chế sự di chuyển tế bào hiệu quả hơn so với DOX tự do. Kết quả này cho thấy tiềm năng của DOX@RNP-N trong ức chế khả năng di căn của các tế bào ung thư trong cơ thể. Các nghiên cứu tiếp theo cần khảo sát các điều kiện về nồng độ và thời gian phù hợp để tìm được công thức tối ưu trong ức chế khả năng di chuyển của tế bào ung thư bằng kết hợp hạt nano và thuốc kháng ung thư.



Hình 5. Độc tính của DOX@RNP-N *in vitro* thử nghiệm trên tế bào ung thư và tế bào thường được xác định bằng phương pháp MTT sau 48 giờ. (A) Dòng tế bào ung thư đại trực tràng C-26; (B) Dòng tế bào ung thư vú MCF-7; (C) Dòng tế bào nội mô bình thường BAEC. Số liệu được trình bày dưới dạng trung bình $\pm$ SD (n=3), với mẫu đối chứng là mẫu tế bào và môi trường mà không có thuốc điều trị. * $p < 0,05$ so với DOX.



Hình 6. Khả năng ức chế di chuyển tế bào ung thư đại trực tràng C-26 của DOX@RNP-N so với DOX. % ức chế sự di chuyển tế bào được tính bằng cách so sánh với mẫu tế bào không điều trị thuốc. Số liệu được thể hiện dưới dạng trung bình $\pm$ SE và * $p < 0,05$.

Kết luận

Trong nghiên cứu này, DOX@RNP-N được tổng hợp với kích thước khoảng 40-60 nm có khả năng nhạy pH và khả năng kháng oxy hoá. Hoạt tính kháng oxy hoá và giải phóng thuốc DOX của hạt nano RNP-N tăng lên ở pH thấp mô phỏng môi trường vi khối u. Hoạt tính kháng các tế bào ung thư của DOX@RNP-N cao hơn và ít độc tính trên tế bào thường so với DOX. Tuy nhiên, ở những nồng độ cao DOX@RNP-N vẫn gây độc trên tế bào thường với tỷ lệ sống sót thấp hơn 80% (hình 5C), do vậy cần tối ưu hoá đặc tính của hạt nano nhằm tăng tính bền khi đi vào tế bào thường để giảm thiểu tác dụng phụ của thuốc. Mặt khác, DOX@RNP-N cũng có khả năng ức chế sự di chuyển của các tế bào ung thư *in vitro* tốt hơn so với DOX. Những kết quả trong nghiên cứu này cho thấy tiềm năng của DOX@RNP-N trong điều trị ung thư và là tiền đề để thực hiện những nghiên cứu *in vivo* cũng như thử nghiệm lâm sàng sau này.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh (đề tài mã số C2019-18-24). Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S. Rivankar (2014), "An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy", *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, **10**(4), pp.853-858.
- [2] D. Hanahan and R.A. Weinberg (2011), "Hallmarks of cancer: the next generation", *Cell*, **114**(5), pp.646-674.
- [3] B.N. Ames, L.S. Gold and W.C. Willett (1995), "The causes and prevention of cancer", *PNAS*, **92**(15), pp.5258-5265.
- [4] J.N. Moloney and T.G. Cotter (2018), "ROS signalling in the biology of cancer", *Semin. Cell Dev. Biol.*, **80**, pp.50-64.
- [5] B.A. Chabner and T.G.J. Roberts (2005), "Timeline: chemotherapy and the war on cancer", *Nature Reviews Cancer*, **5**(1), pp.65-72.

[6] A. Ardizzoni, et al. (2007), "Cisplatin - versus carboplatin-based chemotherapy in first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer: an individual patient data meta-analysis", *J. Natl. Cancer Inst.*, **99**(11), pp.847-857.

[7] Y. Octavia, et al. (2012), "Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies", *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **52**(6), pp.1213-1225.

[8] C. Carvalho, et al. (2009), "Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect", *Curr. Med. Chem.*, **16**, pp.3267-3285.

[9] H.-M. Chiang, et al. (2012), "Nanoscale ZnO induces cytotoxicity and DNA damage in human cell lines and rat primary neuronal cells", *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **12**(3), pp.2126-2135.

[10] P. Fu, Q. Xia, et al. (2014), "Mechanisms of nanotoxicity: generation of reactive oxygen species", *J. Food Drug Anal.*, **22**(1), pp.64-75.

[11] S.M. Moghimi, et al. (2005), "Nanomedicine: current status and future prospects", *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **19**(3), pp.311-330.

[12] S. Singh and A. Singh (2013), "Current status of nanomedicine and nanosurgery", *Anesth. Essays and Res.*, **7**(2), pp.237-242.

[13] N. Pradhan, et al. (2015), "Facets of nanotechnology as seen in food processing, packaging, and preservation industry", *Biomed. Res. Int.*, **2015**, pp.3656-3672.

[14] R. Shanmuganathan, et al. (2019), "Chitosan nanoparticles: an overview of drug delivery against cancer", *Int. J. Biol. Macromol.*, **130**, pp.727-736.

[15] S. Kruszewski and D.M. Kruszevska (2010), "Fluorescence spectroscopy in camptothecins studies", *Acta Phys. Pol. A*, **118**, pp.99-102.

[16] Y. Lu, E. Zhang, J. Yang, and Z. Cao (2018), "Strategies to improve micelle stability for drug delivery", *Nano Res.*, **11**(10), pp.4985-4998.

[17] L.B. Vong and Y. Nagasaki (2016), "Combination treatment of murine colon cancer with doxorubicin and redox nanoparticles", *Mol. Pharm.*, **13**(2), pp.449-455.

[18] J.S. Suk, Q. Xu, N. Kim, J. Hanes, and L.M. Ensign (2016), "PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery", *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **99**, pp.28-51.

[19] Y. Zhou and J. Kopeček (2013), "Biological rationale for the design of polymeric anti-cancer nanomedicines", *J. Drug Target.*, **21**(1), pp.1-26.

[20] R. Misra, S. Acharya, and S.K. Sahoo (2010), "Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy", *Drug Discov. Today*, **15**(19-20), pp.842-850.

[21] L.B. Vong, T. Tomita, T. Yoshitomi, H. Matsui, and Y. Nagasaki (2012), "An orally administered redox nanoparticle that accumulates in the colonic mucosa and reduces colitis in mice", *Gastroenterology*, **143**(4), pp.1027-1036.

[22] T. Yoshitomi, Y. Ozaki, S. Thangavel, and Y. Nagasaki (2013), "Redox nanoparticle therapeutics to cancer - increase in therapeutic effect of doxorubicin, suppressing its adverse effect", *J. Control. Release*, **172**(1), pp.137-143.

[23] I. Sadowska-Bartos and G. Bartosz (2018), "Redox nanoparticles: synthesis, properties and perspectives of use for treatment of neurodegenerative diseases", *J. Nanobiotechnology*, **16**(1), pp.87.

Thẩm định quy trình xác định đồng thời Zidovudin và Lamivudin trên hệ chất mang nano dendrimer G3.0-F127@AZT/3TC bằng phương pháp HPLC-PDA

Nguyễn Thị Thịnh^{1,*}, Nguyễn Cửu Khoa²

¹Viện Kiểm nghiệm thuốc TP Hồ Chí Minh

²Viện Khoa học Vật liệu ứng dụng

Ngày nhận bài 22/3/2021; ngày chuyển phản biện 25/3/2021; ngày nhận phản biện 24/4/2021; ngày chấp nhận đăng 28/4/2021

Tóm tắt:

Nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định đồng thời Zidovudin (AZT) và Lamivudin (3TC) trên nền dendrimer PAMAM biến tính với pluronic F127, ứng dụng làm thuốc chống HIV có kiểm soát. Một phương pháp xác định AZT và 3TC bằng kỹ thuật HPLC-PDA nhanh, chính xác với độ tin cậy và độ chọn lọc cao đã được xây dựng và thẩm định theo hướng dẫn của ICH (Hội nghị quốc tế về hài hòa các thủ tục đăng ký dược phẩm sử dụng cho con người). Quá trình sắc ký được thực hiện trên cột pha đảo C18 sử dụng pha động là dung dịch đệm phosphat pH 2,5 - methanol (65:35), tốc độ dòng 1,0 ml/phút. Bước sóng phát hiện 266 nm. Thời gian lưu của AZT và 3TC lần lượt là 3,5 và 4,3 phút với độ phân giải 3,15. Đường tuyến tính từ 2,16 đến 324,53 µg/ml đối với AZT, và 2,54 đến 152,10 µg/ml đối với 3TC ($r=1,000$); tỷ lệ phục hồi trung bình là 100,30% (RSD=0,36%) đối với AZT và 3TC là 99,73% (RSD=0,50%). Kết quả thẩm định cho thấy đạt độ đúng, chính xác và tính phù hợp của phương pháp trong phân tích hoạt chất AZT và 3TC trên hệ chất mang nano dendrimer PAMAM G3.0-F127@AZT/3TC là đạt yêu cầu.

Từ khóa: dendrimer PAMAM, HIV, HPLC, Lamivudin, Zidovudin.

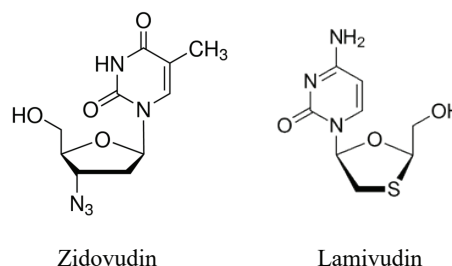
Chỉ số phân loại: 3.4

Mở đầu

HIV (Human Immunodeficiency Virus) là một loại virus gây suy giảm miễn dịch, làm cho cơ thể người mất dần sức đề kháng với các vi sinh vật gây bệnh, tạo ra các nhiễm trùng cơ hội... [1]. Năm 2019, ước tính có 38 triệu người nhiễm HIV-1 trên toàn thế giới [2]. Liệu pháp điều trị sử dụng thuốc kháng retrovirus ARV đã cải thiện đáng kể chất lượng sống của người nhiễm HIV. Tuy nhiên, phác đồ điều trị của phương pháp ARV rất phức tạp và đòi hỏi sự tuân thủ nghiêm ngặt... [3]. Bên cạnh đó, khi xuất hiện đột biến ở gen mã hóa enzyme tích hợp sẽ xuất hiện sự kháng thuốc. Kết quả, có sự kháng thuốc trong phác đồ điều trị và dẫn đến thất bại trong trị liệu. Nhằm cải thiện khả năng điều trị, giảm tác dụng phụ và đơn giản hóa quá trình trị liệu, điều trị kết hợp các thuốc kháng retrovirus có hoạt tính cao với hệ nano mang thuốc phóng thích kéo dài đã được nghiên cứu.

AZT và 3TC là hai loại thuốc đầu tay thuộc nhóm ức chế enzym sao chép ngược tương tự nucleosid và nucleotid (NRTI) nằm trong phác đồ điều trị HIV/AIDS của Bộ Y tế [4] (hình 1). 3TC có thể ức chế cả hai loại (1 và 2) men sao chép ngược trên HIV và trên bệnh viêm gan B [5]. Trong khi đó, AZT làm chậm sự phát triển bệnh và sự nhân lên của virus. 3TC kết hợp với AZT thể hiện tác dụng hiệp đồng chống HIV đối với các chủng

đề kháng với 3TC, bao gồm xuất hiện sự thay đổi acid amin M184V gần vị trí hoạt động của chuỗi sao chép ngược (RT). Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, các chủng virus kháng AZT có thể trở nên nhạy với AZT hơn khi chúng đồng thời đề kháng với 3TC [6, 7]. Đi đôi với hiệu quả điều trị, kết hợp thuốc gây ra nhiều tác dụng phụ thường gặp như nhức đầu, mệt mỏi, buồn nôn, tiêu chảy và sốt. Tác dụng phụ nghiêm trọng có thể gặp là ức chế tủy xương, tổn thương cơ, làm trầm trọng thêm bệnh viêm gan B, tăng lactat trong máu và phình gan [8].



Hình 1. Cấu trúc của AZT và 3TC [9].

Dendrimer PAMAM là một loại vật liệu polyme nano mới lần đầu được phát hiện và tổng hợp trong giai đoạn từ 1970-1990. Trái ngược với các polyme tuyến tính, dendrimer

*Tác giả liên hệ: Email: nguyenthithinh73@gmail.com

Process evaluation for simultaneous determination of Zidovudine and Lamivudine on the nanocarrier dendrimer by HPLC-PDA method

Thi Thinh Nguyen^{1,2*}, Cuu Khoa Nguyen²

¹Institute of Drug Quality Control - Ho Chi Minh City (IDQC-HCMC)

²Institute of Applied Materials Science

Received 22 March 2021; accepted 28 April 2021

Abstract:

To determine Zidovudine (AZT) and Lamivudine (3TC) at the same time based on PAMAM dendrimer modified with Pluronic F127, application as anti-HIV drug control. A fast, accurate HPLC-PDA determination of AZT and 3TC with high reliability and selectivity has been developed and validated according to ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) guidelines. The chromatography was carried out by C18 inversion column using the mobile phase of phosphate buffer solution of pH 2.5 - methanol (65:35), flow rate 1.0 ml/min, and detective wavelength 266 nm. The retention times of AZT and 3TC are 3.5 and 4.3 minutes, respectively with 3.15 resolution. Linearity ranges from 2.16 to 324.53 µg/ml for AZT, and from 2.54 to 152.10 µg/ml for 3TC ($r=1.000$); mean recovery 100.3% (RSD=0.36%) for AZT and 99.73% (RSD=0.50%) for 3TC. The evaluation results showed that the accuracy and suitability of the method in the analysis of active ingredients AZT and 3TC on the PAMAM G3.0-F127@AZT/3TC dendrimer nano carrier system are adequate.

Keywords: HIV, HPLC, Lamivudine, PAMAM dendrimer, Zidovudine.

Classification number: 3.4

PAMAM có các nhóm chức được kiểm soát chính xác và tinh chỉnh được [10]. Sau khi biến tính với các polyme ưa nước có tính tương thích sinh học cao, dendrimer PAMAM có khả năng tránh được sự loại bỏ khỏi hệ tuần hoàn bởi lưới nội chất, đồng thời tăng lượng thuốc mang thông qua cơ chế hấp phụ trên bề mặt hạt, cuốn vào và liên kết với các nhóm chức bên trong hạt [11-13]. Điều này không chỉ giúp vận chuyển thuốc đến đúng mục tiêu, mà còn giảm lượng thuốc sử dụng, giảm độc tính và các tác dụng phụ. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng ARV có thể được mang bên trong các dendrimer PAMAM biến tính như một hệ thống phân phối thuốc [14, 15].

Thuốc được sử dụng trong điều trị HIV trên người nên việc đánh giá chất lượng thuốc cũng không kém phần quan trọng. Kỹ thuật HPLC là một lựa chọn tốt để định lượng đồng thời AZT và 3TC cho độ chính xác cao và có tính chọn lọc. Đã có nhiều chuyên luận trong Dược điển Hoa Kỳ (USP) về xác định AZT hoặc 3TC ở các dạng khác nhau như nguyên liệu, viên nén, viên nang, dung dịch uống, thuốc tiêm [16]. Tuy nhiên, không có phương pháp nào trong số này phân tích đồng thời AZT và 3TC mang trong hạt nano đơn giản và nhanh chóng. Do vậy, nhóm nghiên cứu đã dựa theo chuyên luận của AZT và chuyên luận 3TC [16] trong USP có thay đổi để phù hợp với đối tượng là chất mang nano dendrimer PAMAM G3.0-F127 được mang đồng thời hai thuốc AZT và 3TC, phương pháp đề nghị được thẩm duyệt theo hướng dẫn của ICH và Cục Quản lý dược do có sự thay đổi so với chuyên luận USP.

Phương pháp nghiên cứu

Vật liệu và thiết bị

Hóa chất: chuẩn AZT và 3TC được cung cấp bởi Viện Kiểm nghiệm thuốc TP Hồ Chí Minh. Các hóa chất khác gồm: kali dihydrophosphat, acid phosphoric, triethylamin (Merk, Đức), methanol (J.T. Baker, Mỹ) đều đạt tinh khiết phân tích hoặc HPLC.

Chế phẩm: dendrimer PAMAM G3.0-F127 được Viện Khoa học Vật liệu ứng dụng, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam cung cấp theo kết quả từ các nghiên cứu trước đây [17, 18].

Thiết bị: hệ thống sắc ký lỏng cao áp (HPLC Shimadzu UFLC 20A, đầu dò PDA SPD-M20A, Nhật); cột sắc ký C18 150 x 4,6 mm, 5 µm (Phenomenex, Mỹ); cân phân tích 5 số lẻ MS 105 (Mettler Toledo, Thụy Sĩ); máy đo pH S220-K (Mettler Toledo, Thụy Sĩ); một số thiết bị nghiên cứu khác.

Điều kiện sắc ký:

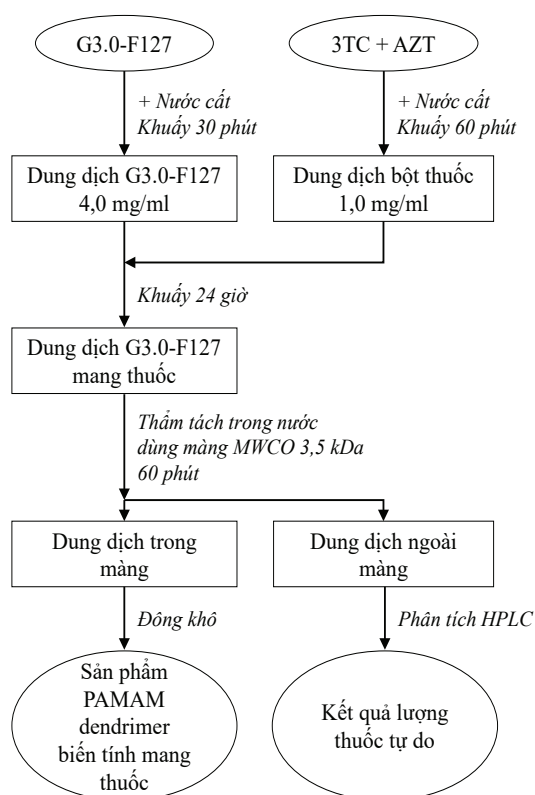
- Pha động: dung dịch đệm phosphat pH 2,5 - methanol (65:35).
- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút.
- Bước sóng phát hiện: 266 nm.
- Thể tích tiêm: 10 µl.

Dung dịch đệm phosphat pH 2,5: cân 0,68 g kali dihydrophosphat hòa tan trong nước vừa đủ 1000 ml, thêm 1

ml triethylamin khuấy đều, điều chỉnh pH $2,5 \pm 0,05$ bằng acid phosphoric. Lọc qua màng lọc 0,45 μm .

Chuẩn bị dendrimer PAMAM biến tính mang thuốc AZT và 3TC (G3.0-F127@AZT/3TC)

Chất mang và thuốc AZT và 3TC được hòa tan trong nước để thu được dung dịch có nồng độ lần lượt là 4,0, 1,0 và 0,5 mg/ml. Nhỏ từ từ dung dịch chứa thuốc vào dung dịch chứa chất mang, khuấy đều trong 24h ở nhiệt độ phòng. Tiến hành thẩm tách 30 phút trong nước sử dụng màng bán thấm MWCO 3,5 kDa, thực hiện lặp lại 2 lần. Lấy phần dung dịch bên trong màng đông khô để thu dendrimer PAMAM biến tính đã mang thuốc. Phần dung dịch bên ngoài màng cũng được thu lại để xác định lượng thuốc tự do. Quy trình mang thuốc được thể hiện ở hình 2 và sản phẩm dendrimer PAMAM biến tính mang thuốc được thể hiện ở hình 3.



Hình 2. Quy trình mang thuốc.



Hình 3. Sản phẩm dendrimer PAMAM biến tính mang thuốc.

Dung dịch AZT chuẩn: cân chính xác 20,0 mg chuẩn AZT cho vào bình định mức 20 ml, thêm khoảng 14 ml nước tinh khiết, lắc đều cho tan hoàn toàn, thêm nước đến vạch. Lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 μm .

Dung dịch 3TC chuẩn: cân chính xác 10,0 mg chuẩn 3TC cho vào bình định mức 20 ml, thêm khoảng 14 ml nước tinh khiết, lắc đều cho tan hoàn toàn, thêm nước đến vạch. Lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 μm .

Dung dịch placebo: dung dịch dendrimer PAMAM biến tính (G3.0-F127) không mang thuốc nồng độ 4,0 mg/ml.

Dung dịch placebo bổ sung chuẩn AZT và 3TC: dung dịch placebo bổ sung đồng thời chuẩn AZT và 3TC với nồng độ lần lượt 100 và 50 $\mu\text{g/ml}$.

Dung dịch mẫu thử: pha dung dịch mẫu thử từ hệ mang thuốc G3.0-F127@AZT/3TC trong nước để có nồng độ AZT khoảng 100 $\mu\text{g/ml}$.

Tiến hành thẩm định

Thẩm định phương pháp phân tích với các chỉ tiêu: tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ), độ chính xác và độ đúng.

Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống sắc ký: tiêm dung dịch chuẩn hỗn hợp vào hệ thống sắc ký. Hệ số đối xứng của AZT và 3TC trong khoảng 0,8-2,0, độ lệch chuẩn tương đối về diện tích pic AZT và 3TC của 6 lần tiêm không quá 2,0%. Độ phân giải giữa AZT và 3TC không nhỏ hơn 2,0. Số đĩa lý thuyết của AZT và 3TC không ít hơn 2000.

Tính đặc hiệu: tính đặc hiệu được đánh giá bằng cách so sánh các pic sắc ký sau: dung dịch AZT chuẩn nồng độ 100 $\mu\text{g/ml}$, dung dịch 3TC chuẩn nồng độ 50 $\mu\text{g/ml}$, dung dịch placebo và dung dịch mẫu trắng bổ sung AZT (100 $\mu\text{g/ml}$) và 3TC (50 $\mu\text{g/ml}$).

Để đạt được tính đặc hiệu, trên sắc ký đồ của mẫu trắng và placebo không được có pic trùng với pic của AZT và 3TC. Các pic trên sắc ký đồ của placebo bổ sung AZT và 3TC tương ứng với pic của AZT và 3TC. Ngoài ra, độ tinh khiết của pic sắc ký trong dung dịch AZT chuẩn và dung dịch 3TC chuẩn phải được đánh giá thông qua phổ UV ghi nhận bằng đầu dò PDA.

Tính tuyến tính: xây dựng đường chuẩn từ dãy chuẩn gồm năm điểm nồng độ. Mỗi dung dịch được đo ba lần độc lập. Hệ số tương quan tuyến tính (R^2) của đường chuẩn không nhỏ hơn 0,998.

LOD và LOQ: là hai thông số quan trọng nhằm đánh giá độ nhạy của phương pháp. Giá trị LOD và LOQ được xác định thông qua đường chuẩn.

LOD và LOQ được tính bằng phương trình hồi quy theo công thức sau:

$$\text{LOD} = 3,3 \cdot \text{SD}/a$$

$$LOQ = 10 \cdot SD/a$$

Trong đó: a là độ dốc của đường chuẩn tuyến tính; SD là độ lệch chuẩn của tín hiệu.

Độ chính xác: độ lặp lại được đánh giá thông qua phân tích mẫu thử 6 lần độc lập trong cùng một ngày. Trong khi đó, độ chính xác trung gian được đánh giá thông qua việc chuẩn bị mẫu thử theo quy trình giống nhau, nhưng tiến hành phân tích khác thời điểm, khác thiết bị và điều kiện môi trường. Độ chính xác được biểu thị thông qua độ lệch chuẩn tương đối (RSD).

Độ đúng: các dung dịch placebo bổ sung chuẩn AZT và 3TC ở các nồng độ 80, 100 và 120% so với nồng độ định lượng được chuẩn bị và phân tích. Mỗi nồng độ thực hiện 3 mẫu độc lập. Tỷ lệ phục hồi cho phép từ 98 đến 102%.

Xử lý kết quả: sử dụng Microsoft Excel 2019 để xử lý số liệu thực nghiệm. Sự tương quan giữa các dữ liệu được kiểm định thông qua hồi quy tương quan với khoảng tin cậy 95%.

Kết quả và thảo luận

Thẩm định phương pháp

Tính tương thích hệ thống: kết quả bảng 1 và 2 cho thấy các thông số ghi nhận đều đạt yêu cầu. Do đó, phương pháp đạt tương thích hệ thống phân tích AZT và 3TC.

Bảng 1. Tính tương thích hệ thống AZT.

TT	(1)	(2)	(3)	(4)
1	3,523	2579177	2689	1,30
2	3,528	2580087	2708	1,30
3	3,520	2581305	2711	1,30
4	3,516	2580284	2708	1,30
5	3,526	2579433	2713	1,30
6	3,525	2580606	2705	1,30
Trung bình	3,523	2580149	2706	1,18
RSD (%)	0,12	0,03		

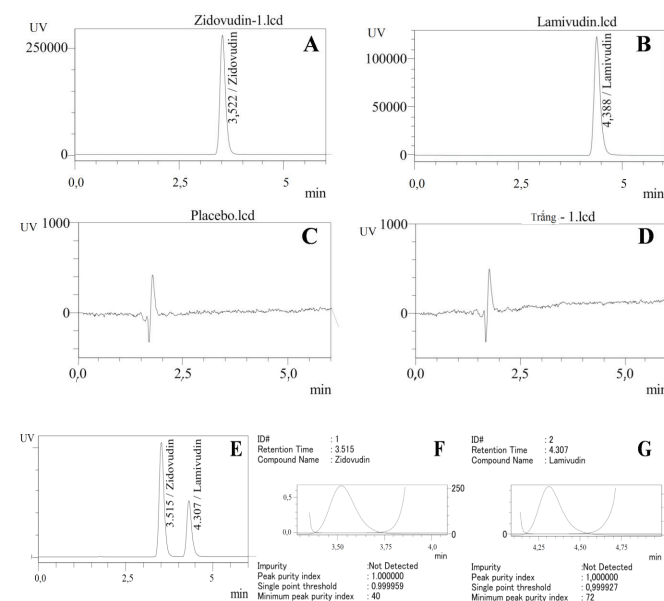
Yêu cầu: (1) Thời gian lưu (phút): %RSD ≤ 2,0%; (2) Diện tích pic: %RSD ≤ 2,0%; (3) Số đĩa lý thuyết: ≥ 2000; (4) Hệ số đối xứng: ≤ 2,0.

Bảng 2. Tính tương thích hệ thống 3TC.

TT	(1)	(2)	(3)	(4)
1	4,388	1290596	4007	1,38
2	4,394	1293165	4036	1,38
3	4,385	1293468	4041	1,38
4	4,379	1294678	4027	1,38
5	4,388	1291936	4056	1,38
6	4,385	1294378	4054	1,39
Trung bình	4,387	1293037	4037	1,18
RSD (%)	0,11	0,12		

Yêu cầu: (1) Thời gian lưu (phút): %RSD ≤ 2,0%; (2) Diện tích pic: %RSD ≤ 2,0%; (3) Số đĩa lý thuyết: ≥ 2000; (4) Hệ số đối xứng: ≤ 2,0.

Tính đặc hiệu: thời gian lưu của AZT và 3TC lần lượt là 3,5 và 4,3 phút (hình 4A và 4B). Không xuất hiện pic có cùng thời gian lưu với AZT và 3TC khi phân tích mẫu placebo và mẫu trắng (hình 4C và 4D). Mẫu placebo bổ sung AZT và 3TC có các pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của AZT và 3TC trong mẫu chuẩn. Ngoài ra, độ tinh khiết pic thu được từ mẫu placebo bổ sung AZT và 3TC lớn hơn 99,0% cho thấy rằng các thành phần khác trong mẫu thử không rửa giải cùng lúc với AZT và 3TC (hình 4E, 4F và 4G). Từ kết quả thu được cho thấy, phương pháp đạt tính đặc hiệu đối với AZT và 3TC trên nền dendrimer PAMAM biến tính.

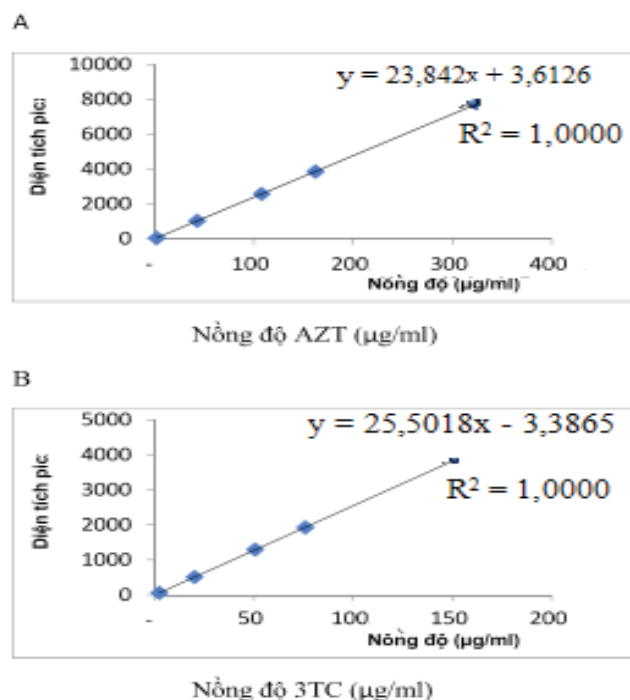


Hình 4. Sắc ký đồ của AZT nồng độ 100 µg/ml (A), 3TC nồng độ 50 µg/ml (B), mẫu placebo (C), mẫu trắng (D), sắc ký đồ và phổ UV từng thành phần của mẫu placebo bổ sung AZT 100 µg/ml và 3TC 50 µg/ml (E, F, G). min: phút; ID#: mã định danh; Retention Time: thời gian lưu; Compound Name: tên hoạt chất; Impurity: độ không tinh khiết; Not Detected: không phát hiện; Peak purity index: chỉ số độ tinh khiết pic; Single Point Threshold: ngưỡng điểm duy nhất; Minimum Peak Purity Index: chỉ số độ tinh khiết định tối thiểu.

Tính tuyến tính, LOD và LOQ: đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa nồng độ thuốc và diện tích pic được xây dựng theo phương pháp hồi quy tuyến tính trên phần mềm Microsoft Excel 2019.

Đối với thuốc AZT, đồ thị là một đường thẳng đi từ 2,16 đến 324,53 µg/ml (hình 5A). Độ tuyến tính được xác định thông qua phương trình “y = 23,842x + 3,6126”, trong đó y và x lần lượt là diện tích pic và nồng độ AZT (µg/ml). Điểm chặn của đồ thị được kiểm tra (hồi quy tương quan, khoảng tin cậy 95%) và cho thông số không có ý nghĩa thống kê với p = 0,29 (p > 0,05). Do đó, có thể nhận định đồ thị đi qua gốc tọa độ [19, 20]. Hệ số tương quan tuyến tính (R²) bằng 1,0000 cho thấy mối tương quan có ý nghĩa giữa nồng độ và diện tích pic. LOD và LOQ có giá trị lần lượt là 0,58 và 1,76 µg/ml.

Tương tự, đồ thị của thuốc 3TC là một đường thẳng đi từ 2,54 đến 152,10 $\mu\text{g/ml}$ (hình 5B). Độ tuyến tính được xác định thông qua phương trình " $y = 25,5018x - 3,3865$ ", trong đó y và x lần lượt là diện tích pic và nồng độ 3TC ($\mu\text{g/ml}$). Điểm chặn của đồ thị được kiểm tra (hồi quy tương quan, khoảng tin cậy 95%) và cho thông số không có ý nghĩa thống kê với $p=0,30$ ($p>0,05$). Hệ số tương quan tuyến tính (R^2) lớn hơn 0,998 cho thấy mối tương quan có ý nghĩa giữa nồng độ và diện tích pic. LOD và LOQ có giá trị lần lượt là 0,52 và 1,59 $\mu\text{g/ml}$.



Hình 5. Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa nồng độ AZT và diện tích pic (A); nồng độ 3TC và diện tích pic (B).

Độ chính xác: độ lặp lại và độ chính xác trung gian được thể hiện thông qua độ lệch chuẩn tương đối (RSD). Dữ liệu độ chính xác được thể hiện trong bảng 3. Giá trị RSD ở tất cả các thời điểm của AZT và 3TC đều nhỏ hơn 2,0%, do đó phương pháp đạt độ chính xác.

Bảng 3. Độ chính xác của AZT và 3TC.

Độ chính xác	(1)	(2)	(3)	(4)
Hàm lượng (%)	10,81	10,60	4,90	4,95
	10,93	10,53	4,95	4,93
	10,90	10,61	4,93	4,95
	10,85	10,64	4,92	4,97
	10,89	10,59	4,93	4,95
	10,84	10,57	4,91	4,94
RSD ⁽¹⁾ (%)	0,41	0,35	0,36	0,26
x_b (%)	10,73		4,94	
RSD ⁽²⁾ (%)	1,41		0,40	

Ghi chú: (1): AZT (ngày 1); (2): AZT (ngày 2); (3): 3TC (ngày 1); (4): 3TC (ngày 2); RSD⁽¹⁾ (%): n=6; RSD⁽²⁾ (%): n=12.

Độ đúng và khoảng xác định: độ đúng của phương pháp sắc ký cao áp được thể hiện thông qua tỷ lệ phục hồi của AZT hoặc 3TC được thêm vào mẫu placebo. Tỷ lệ phục hồi nằm trong khoảng 98,98 đến 100,97% như mô tả ở bảng 4 và 5. Tất cả các giá trị này đều nằm trong khoảng 98-102% so với nồng độ lý thuyết.

Bảng 4. Kết quả khảo sát độ đúng AZT.

Độ đúng (%)	(1)	(2)	(3)	RSD
80	87,56	87,69	100,14	0,21
	87,76	87,69	99,93	
	88,06	87,82	99,73	
100	109,45	109,74	100,26	0,12
	109,65	109,87	100,20	
	109,25	109,73	100,44	
120	131,14	131,84	100,53	0,27
	131,34	131,96	100,47	
	130,84	132,11	100,97	
Tỷ lệ phục hồi trung bình			100,30	

Ghi chú: (1): nồng độ chuẩn AZT thêm vào ($\mu\text{g/ml}$); (2): nồng độ chuẩn AZT tìm lại ($\mu\text{g/ml}$); (3): tỷ lệ phục hồi (%).

Bảng 5. Kết quả khảo sát độ đúng 3TC.

Độ đúng (%)	(1)	(2)	(3)	RSD
80	40,20	39,91	99,28	0,52
	40,00	39,99	99,98	
	40,50	40,09	98,98	
100	50,00	50,06	100,12	0,51
	50,30	50,17	99,74	
	50,50	50,05	99,11	
120	60,20	60,25	100,09	0,28
	60,40	60,32	99,86	
	60,10	60,35	100,41	
Tỷ lệ phục hồi trung bình			99,73	

Ghi chú: (1): nồng độ chuẩn 3TC thêm vào ($\mu\text{g/ml}$); (2): nồng độ chuẩn 3TC tìm lại ($\mu\text{g/ml}$); (3): tỷ lệ phục hồi (%).

Áp dụng phương pháp đã thẩm định xác định AZT và 3TC được mang trên dendrimer PAMAM biến tính

Dung dịch chuẩn AZT, 3TC được chuẩn bị như trong quy trình, mẫu dendrimer PAMAM biến tính mang thuốc đơn và mang thuốc kết hợp được chuẩn bị như sau: cân chính xác một lượng chế phẩm cho vào bình định mức thích hợp, thêm nước, siêu âm và lắc trong 30 phút, để nguội về nhiệt độ phòng rồi thêm nước đến vạch để có nồng độ AZT khoảng 0,1 mg/ml, lọc qua màng lọc 0,45 μm , tiêm vào hệ thống sắc ký. Nồng độ thuốc tự do, tổng lượng thuốc mang trong hệ dendrimer PAMAM và các thông số mang thuốc được xác định (bảng 6).

Bảng 6. Kết quả mang thuốc.

Kết quả mang thuốc đơn					
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
AZT	200,2	50,02	26,10	24,96	5,87
3TC	200,1	25,05	13,12	24,90	3,02
Kết quả mang thuốc phối hợp					
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
AZT	200,0	50,20	35,04	29,92	5,54
3TC	200,0	25,04	17,14	31,44	2,94

Ghi chú: (1): khối lượng G3.0-F127 (mg); (2): khối lượng thuốc đầu vào (mg); (3): khối lượng thuốc tự do (mg); (4): hiệu quả mang thuốc (DLE %); (5): khả năng mang thuốc (DLC %).

Kết quả phân tích cho thấy, không có sự khác biệt đáng kể về hiệu quả mang thuốc (DLE), khả năng mang thuốc (DLC) khi tiến hành mang thuốc đơn và mang thuốc kết hợp.

Năm 2013, P. Dinesh Kumar và cs đã tổng hợp được dendrimer thế hệ G4.0 và G5.0, biến tính bề mặt với PEG và mang thuốc 3TC, xác định lượng thuốc được mang bằng phương pháp quang phổ tử ngoại khả kiến ở bước sóng 272 nm [21]. Bên cạnh đó, đã có nhiều nghiên cứu mang thuốc kháng virus trên chất mang dendrimer, tuy nhiên chỉ mang một thuốc và xác định bằng phương pháp quang phổ tử ngoại khả kiến. Do vậy, với phương pháp đã nghiên cứu xây dựng cho phép xác định đồng thời hai thuốc AZT và 3TC bằng HPLC-PDA, mở ra hướng mới trong việc tạo ra hệ mang thuốc đôi hoặc ba trên nền chất mang nano dendrimer biến tính mà với phương pháp quang phổ tử ngoại khả kiến không thể xác định được.

Kết luận

Phương pháp sắc ký lỏng cao áp HPLC-PDA đã được xây dựng nhằm xác định đồng thời hai thuốc kháng virus AZT và 3TC được mang trên nền chất mang nano dendrimer PAMAM biến tính với pluronic F127 sử dụng cột pha đảo C18 được thẩm định theo hướng dẫn của ICH cho kết quả nhanh, chính xác, có độ chọn lọc cao. Kết quả nghiên cứu có thể ứng dụng và định hướng trong nghiên cứu xác định các hoạt chất khi mang cùng lúc 2 hay 3 hoạt chất trên cùng một chất mang nano sinh học là xu hướng mới hiện nay của ngành dược không những trong nước mà cả trên thế giới nhằm mục đích cải thiện hiệu quả điều trị, nâng cao chất lượng của sản phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Marta K. Powell, et al. (2016), "Opportunistic infections in HIV-infected patients differ strongly in frequencies and spectra between patients with low CD4+ cell counts examined postmortem and compensated patients examined Antemortem irrespective of the HAART era", *PLOS ONE*, **11**(9), DOI: 10.1371/journal.pone.0162704.
- [2] Joris Hemelaar, et al. (2020), "Global and regional epidemiology of HIV-1 recombinants in 1990-2015: a systematic review and global survey", *The Lancet HIV*, **7**(11), DOI: 10.1016/S2352-3018(20)30252-6.
- [3] World Health Organization and Initiative Stop Tb (2010), *Treatment of tuberculosis: guidelines*, World Health Organization.

[4] World Health Organization (2002), *WHO model list of essential medicines*.

[5] Zoe Fox, et al. (2006), "A randomized trial to evaluate continuation versus discontinuation of lamivudine in individuals failing a lamivudine-containing regimen: the COLATE trial", *Antiviral Therapy*, **11**, pp.761-770.

[6] Hiroaki Mitsuya, et al. (1990), "Molecular targets for AIDS therapy", *Science*, **249**, pp.1533-1544.

[7] Marcus Vinícius Nora De Souza (2005), "Fármacos inibidores de fusão: uma nova estratégia no combate à replicação do vírus VIH", *Acta Farmacêutica Bonaerense*, **24**(2), pp.291-299.

[8] M.D. Faaem, et al. (2017), *Tarascon pocket pharmacopoeia 2017 deluxe lab-coat edition*, Publisher Jones & Bartlett Learning.

[9] Prashant M. Bhatt, et al. (2009), "Co-crystals of the anti-HIV drugs lamivudine and zidovudine", *Crystal. Growth and Design*, **9**(2), pp.951-957.

[10] Prashant Kesharwani, et al. (2014), "Dendrimer as nanocarrier for drug delivery", *Progress in Polymer Science*, **39**, pp.268-307.

[11] Tong Nhat Anh, et al. (2015), "Preparation of the cationic dendrimer-based hydrogels for controlled heparin release", *Journal of Macromolecular Science, Part A*, **52**(10), pp.830-837.

[12] Thanh Luan Nguyen, et al. (2017), "Redox and pH responsive poly (amidoamine) dendrimer-heparin conjugates via disulfide linkages for letrozole delivery", *BioMed Research International*, **2017**, DOI: 10.1155/2017/8589212.

[13] Ning Li, et al. (2017), "Enzyme-sensitive and amphiphilic PEGylated dendrimer-paclitaxel prodrug-based nanoparticles for enhanced stability and anticancer efficacy", *ACS Applied Materials & Interfaces*, **9**(8), pp.6865-6877.

[14] Sushama Telwatte, et al. (2011), "Virucidal activity of the dendrimer microbicide SPL7013 against HIV-1", *Antiviral Research*, **90**, pp.195-199.

[15] Tathagata Dutta, K. Jain Narendra (2007), "Targeting potential and anti-HIV activity of lamivudine loaded mannosylated poly (propyleneimine) dendrimer", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, **1770**, pp.681-686.

[16] United States Pharmacopeial Convention (2018), *U.S. Pharmacopeia National Formulary 2019: UPS42-NF37*.

[17] Vu Minh Thanh, et al. (2018), "Low systemic toxicity nanocarriers fabricated from heparin-mPEG and PAMAM dendrimers for controlled drug release", *Mater. Sci. Eng. C*, **82**, pp.291-298.

[18] Nguyễn Cửu Khoa và cs (2018), *Báo cáo kết quả đề tài "Nghiên cứu tổng hợp phức chất carboplatin/PAMAM và oxaliplatin/PAMAM định hướng làm thuốc chống ung thư"*, Viện Khoa học Vật liệu ứng dụng.

[19] Joses Ho, et al. (2019), "Moving beyond P values: data analysis with estimation graphics", *Nature Methods*, **16**(7), pp.565-566.

[20] Milena Cristina Ribeiro Souza Magalhães, et al. (2017), "Development and validation of a high performance liquid chromatographic method determination of Zidovudine encapsulated in PCL nanoparticles", *Drug. Analytical Research*, **1**(2), pp.1-8.

[21] P. Dinesh Kumar, et al. (2013), "Prolonged drug delivery system of PEGylated PAMAM dendrimers with a anti-HIV drug", *Research in Pharmacy*, **3**(2), pp.8-17.

Nghiên cứu tính ức chế thực vật của 6 loài cây họ cúc (Asteraceae) và định lượng hàm lượng phenolic và flavonoid tổng

Ngô Chí Nam¹, Phan Khánh Linh², Hồ Lệ Thi^{2*}

¹Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

²Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long

Ngày nhận bài 2/2/2021; ngày chuyển phản biện 8/2/2021; ngày nhận phản biện 5/4/2021; ngày chấp nhận đăng 9/4/2021

Tóm tắt:

Mục đích của nghiên cứu này là xác định khả năng đối kháng thực vật của dịch trích MeOH từ 6 loài cây họ cúc (Asteraceae), bao gồm sài đất (*Wedelia chinensis*), hướng dương (*Helianthus annuus*), sao nháy (*Cosmos bipinnatus*), vạn thọ (*Tagetes erecta*), dã quỳ (*Tithonia diversifolia*) và cúc nhám (*Zinnia elegans*) lên cỏ lồng vực nước (*Echinochloa crus-galli* L.) và cải bẹ xanh (*Brassica juncea*) ở các nồng độ khác nhau: 0,03, 0,1, 0,3 và 1 g/ml. Kết quả cho thấy, dịch trích 6 loài cây họ cúc có khả năng ức chế chiều dài thân và rễ cỏ lồng vực nước, cải bẹ xanh ở mức độ khác nhau, trong đó dịch trích từ cây sao nháy cho kết quả ức chế ổn định nhất. Ở nồng độ 0,03 g/ml, dịch trích này ức chế chiều dài thân, rễ cây cải bẹ xanh là 23,01 và 56,45%; cỏ lồng vực nước là 8,5 và 36,35%. Ở nồng độ 1 g/ml, dịch trích cây sao nháy ức chế chiều dài thân cải bẹ xanh và cỏ lồng vực nước lần lượt là 97,54 và 88,15%, chiều dài rễ lần lượt là 93,52 và 99,99%. Hàm lượng phenolic tổng của dịch trích cây sao nháy, sài đất, hướng dương, dã quỳ, vạn thọ và cúc nhám lần lượt là 4,51, 3,96, 1,05, 1,45, 3,61 và 0,99 mg/g; hàm lượng flavonoid tổng tương ứng là 1,58, 0,76, 0,29, 0,39, 0,65 và 0,45 mg/g. Như vậy, dịch trích từ cây sao nháy có triển vọng cao để ứng dụng trong việc phòng trừ cỏ lồng vực nước bằng biện pháp sinh học, an toàn với môi trường.

Từ khóa: Asteraceae cải bẹ xanh (*Brassica juncea*), cỏ lồng vực nước (*Echinochloa crus-galli* L.), flavonoid, phenolic, tính đối kháng thực vật.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Cỏ lồng vực nước thuộc nhóm thực vật C4, kích thước lớn, thích hợp nơi đất ẩm, giàu đạm, có mặt rộng khắp ở các vùng trồng lúa nước, khả năng cạnh tranh cao về dinh dưỡng, nước, ánh sáng... với cây lúa, ảnh hưởng rõ rệt đến năng suất, thậm chí có thể làm giảm đến 100% năng suất lúa.

Tính kháng thuốc diệt cỏ có tác động tiêu cực đến sản xuất mà một trong những nguyên nhân quan trọng là sử dụng cùng một loại thuốc diệt cỏ trong nhiều mùa vụ [1]. Tại Brazil, cỏ lồng vực nước thể hiện tính kháng với hoạt chất imidazilinone 81% (624 mẫu) và quinclorac 19% [2]. Một nghiên cứu cho thấy, cỏ lồng vực nước có thể kháng nhiều loại hoạt chất như: bispyribac-sodium, quinclorac, metamifop... [3]. Cỏ lồng vực nước (An Giang, Kiên Giang, Vĩnh Long) thể hiện tính kháng thuốc ở liều khuyến cáo với hóa chất quinclorac (9/15 mẫu).

Do có khả năng ức chế sinh trưởng và phát triển của cỏ dại, không ảnh hưởng đến môi trường cũng như sức khỏe con người, các chất chuyển hóa thứ cấp từ thực vật đã và đang có xu hướng được sử dụng nhiều trong sản xuất [4-6]. Allelopathy là một cơ chế đối kháng thực vật diễn ra trong cây, các chất hóa học được gọi là allelochemicals (CDK) do cây sinh ra sẽ tác động đến sự phát triển của một số loài cây khác bao gồm cả cỏ dại. Những chất này được phóng thích từ thực vật vào đất bằng

cách tiết ra từ rễ hoặc từ sự phân hủy các mô thực vật [7, 8].

Một số công trình nghiên cứu trên thế giới khẳng định, các loài cây họ cúc chứa CDK như Alpha-terthienyl (α -T) trong rễ cây vạn thọ (*Tagetes erecta*), phenylheptatriene (PHT) từ lá cây cúc áo (*Bidens pilosa* L.) ức chế nảy mầm cỏ ba lá (*Trifolium pratense*), cỏ đuôi mèo (*Phleum pratense*) [9]; hợp chất phenolic [10] từ cây hướng dương, terpenoides từ lá cây hướng dương khô trong dung môi CH_2Cl_2 ức chế lúa mì (*Triticum aestivum* L. cv. Duro) [11]; dehydrocostus lactone, costunolide, 15-isovaleroyloxycostunolide trong cây sao nháy [12] ức chế cỏ lồng vực nước và cây rau dền (*Amaranthus hypochondriacus*); dịch trích cây hướng dương ức chế cây mù tạt (*Brassica kaber*) [13], cải đại (*Sinapis arvensis*), cỏ đuôi chồn (*Setaria viridis*) [14]; dịch trích cây dã quỳ ức chế cây bắp (*Zea mays* L.) [15], lúa [16]; dịch trích cây sài đất ức chế cây rau dền (*Alternanthera philoxeroides*), cỏ hôi (*Eragrostis ciliaris*) [17], lúa (*Oryza sativa* L.) [18], cỏ gà (*Cynodon dactylon*) và cỏ Bahia (*Paspalum notatum*) - một loài cỏ bản địa ở Mexico [19]; dịch trích của cây cúc nhám ức chế cây bắp [20]; dịch trích sao nháy có khả năng làm giảm tỷ lệ nảy mầm, chiều dài rễ hoặc thân mầm cây lúa mì, cỏ ba lá, cỏ lúa mạch (*Lolium multiflorum*), cải bẹ xanh, cà chua Tomatillo (*Physalis ixocarpa*) và củ cải (*Raphanus sativus*) [21].

* Tác giả liên hệ: Email: thihl.clrri@mard.gov.vn

A study on the allelopathic activity and quantitative determination of total phenolic and flavonoid of six plants in the Asteraceae family

Chi Nam Ngo¹, Khanh Linh Phan², Le Thi Ho^{2*}

¹College of Agriculture, Can Tho University

²Cuu Long Delta Rice Research Institute

Received 2 February 2021; accepted 9 April 2021

Abstract:

This study aims to determine the allelopathic activities of six plants that belong to Asteraceae family such as China wedelia (*Wedelia chinensis*), sunflower (*Helianthus annuus*), cosmos (*Cosmos bipinnatus*), marigolds (*Tagetes erecta*), Mexico sunflower (*Tithonia diversifolia*), and zinnia (*Zinnia elegans*) by applying their methanolic extracts on barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli* L.) and mustard green (*Brassica juncea*) with different concentrations (0.03, 0.1, 0.3, 1 g/ml). Results conducted from the study showed that the aqueous solutions extracted from the above-mentioned plants inhibited shoot and root length of barnyardgrass, mustard green at different intensity ranges in which cosmos aqueous extract gave the strongest impact, says, 23.01 and 97.54% of shoot length inhibition; 56.45 and 93.52% of root length inhibition at 0.3 and 1.0 g/ml respectively for mustard green. In case of barnyardgrass, the same results were also reported, says, 8.5 and 88.15% of shoot length inhibition; 36.35 and 99.99% of root length inhibition at 0.3 and 1.0 g/ml respectively. Total phenolic contents of the fresh plants of cosmos, China wedelia, sunflower, Mexico sunflower, marigolds and zinia were 4.51, 3.96, 1.05, 1.45, 3.61, and 0.99 mg/g, respectively; their total flavonoid contents were 1.58, 0.76, 0.29, 0.39, 0.65, and 0.45 mg/g, respectively. It is obvious that cosmos aqueous extract can be effectively and safely used for biological control of barnyardgrass.

Keywords: allelopathic activities, Asteraceae, *Brassica juncea*, *Echinochloa crus-galli* L., flavonoid, phenolic.

Classification number: 4.1

Cho tới nay, Việt Nam vẫn chưa có công trình khoa học nào về phân loại tính đối kháng cỏ dại trong các loài cây trồng thuộc họ cúc nên nghiên cứu vấn đề này để làm cơ sở cho việc phân lập và định danh các CĐK, ứng dụng CĐK trong phòng trừ sinh học cỏ lồng vực nước trong ruộng lúa là rất cần thiết.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Cây vật liệu: dã quỳ, sài đất, cúc nhám, hướng dương, sao nháy và vạn thọ được thu tại Cần Thơ và Vĩnh Long vào giai đoạn ra hoa.

Cây thử nghiệm: hạt cỏ lồng vực nước, cỏ lồng vực cạn được thu từ ruộng thực nghiệm của Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long. Cải bẹ xanh, sử dụng như là loài so sánh được lấy giống từ Công ty TNHH thương mại Trang Nông (xã Vĩnh Lộc B, huyện Bình Chánh, TP Hồ Chí Minh).

Các loại hóa chất, thiết bị và dụng cụ thí nghiệm có nguồn gốc rõ ràng và được phép sử dụng trong các phòng thí nghiệm.

Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết chất đối kháng thực vật: rửa sạch thân, lá, rễ từng loài cúc vào giai đoạn ra hoa, cắt nhỏ 40 g hỗn hợp các bộ phận của cây rồi cho vào bình tam giác với 400 ml MeOH (60%) ngâm trong 48h, sau đó lọc qua giấy thấm, lấy dịch chiết lần thứ nhất trữ vào tủ mát (5-8°C) rồi tiếp tục chiết lần hai bằng 200 ml MeOH 100% ngâm trong 48h. Dung dịch trích cả 2 lần được làm bay hơi dung môi MeOH ở 40-55°C bằng máy cô quay chân không thu được 80 ml dịch trích nước có khả năng chứa chất đối kháng. Dịch trích sau đó được chuẩn độ pH bằng phosphate buffer để đạt được 6,5.

Đánh giá khả năng ức chế của dịch trích lên cây thử nghiệm: cho dịch trích vào đĩa petri có lót giấy lọc với nồng độ tính theo khối lượng tươi của cây họ cúc sử dụng trong thí nghiệm là 0,03, 0,1, 0,3 và 1 g chất tươi/ml. Dịch trích được cho bốc hơi khô trong buồng hút cho tới khi khô hoàn toàn nhằm loại bỏ toàn bộ MeOH còn dư trong dịch trích, sau đó giấy lọc có chứa CĐK khô được làm ẩm lại với 1 ml dung dịch tween 20 (0,05%). 10 hạt cỏ lồng vực nước đã nảy mầm được gieo trên giấy lọc, đặt nắp đĩa và ủ tối ở 25°C. Đối với nghiệm thức đối chứng, hạt cỏ nảy mầm được gieo lên trên giấy lọc với 1 ml dung dịch tween 20 [22]. Thực hiện tương tự với cải bẹ xanh. Chiều dài thân và rễ của cỏ lồng vực nước và cải bẹ xanh được đo sau 48h; tính độ hữu hiệu theo công thức của Abbott.

Đánh giá định tính và định lượng hàm lượng phenolic tổng và flavonoid tổng từ dịch trích:

- Đánh giá định tính hợp chất phenolic và flavonoid: sử dụng 50 µl dịch trích MeOH của mỗi loài cây họ cúc, thêm 500 µl H₂O và 2-3 giọt FeCl₃ (5%), nếu dịch trích có kết tủa màu xanh lam, xanh lá cây hoặc đen tức là có sự hiện diện của hợp chất phenolic và tannin [23].

Sử dụng 50 µl dịch trích MeOH của mỗi loài cây họ cúc, thêm 500 µl Pb(CH₃COO)₂ (10%). Nếu kết quả dịch trích cho kết tủa màu vàng tức là có sự hiện diện của hợp chất flavonoid [24].

- Định lượng phenolic tổng trong dịch trích: hàm lượng phenolic tổng được xác định theo mô tả của Yadav và Agarwala (2011) [25]. Sử dụng MeOH pha loãng dịch trích tới nồng độ 1 mg/ml. Xây dựng đường chuẩn axit gallic theo dãy nồng độ 0,02, 0,04, 0,06, 0,08, 0,10 và 0,12 mg/ml và thuốc thử folin-ciocalteu 10%. Hòa trộn 1 ml axit gallic của đường chuẩn hoặc mẫu dịch trích vào 2,5 ml folin-ciocalteu 10% để phản ứng trong 5 phút rồi thêm 2 ml Na_2CO_3 2% và ủ 45 phút, cuối cùng xác định độ hấp thụ bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 765 nm.

- Định lượng flavonoid tổng trong dịch trích: hàm lượng flavonoid tổng được xác định theo mô tả của Chang và cs (2002) [26]. Dịch trích được pha loãng với MeOH đạt nồng độ 1 mg/ml. Xây dựng đường flavonoid chuẩn quercetin theo dãy nồng độ 0,02, 0,04, 0,06, 0,08 và 0,1 mg/ml. Pha loãng 0,5 ml dung dịch quercetin của đường chuẩn hoặc mẫu dịch trích trong 1,5 ml MeOH, sau đó nhỏ 0,1 ml AlCl_3 10% để phản ứng trong 6 phút rồi thêm 0,1 ml CH_3COOK 1 M và 2,8 ml nước cất, lắc đều và ủ trong 45 phút, cuối cùng xác định độ hấp thụ bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 415 nm.

Kết quả và thảo luận

Khả năng ức chế của dịch trích MeOH từ 6 loài cây họ cúc lên chiều dài thân và rễ cây cải bẹ xanh

Dịch trích MeOH từ 6 loại cây vật liệu có khả năng ức chế chiều dài thân và rễ cây cải bẹ xanh (bảng 1), trong đó, các cây sao nháy, dã quỳ (hình 1), cúc nhám và vạn thọ ở nồng độ 1 g/ml có hiệu quả ức chế chiều dài thân cải bẹ xanh mạnh nhất (lần lượt là 97,54, 97,01, 91,26 và 91,12%), khác biệt có ý nghĩa so với dịch trích cây hướng dương (80,35%) và sài đất (76,01%). Tương tự, ở nồng độ 0,03 g/ml, dịch trích MeOH của cây sao nháy và vạn thọ ức chế thân cải bẹ xanh lần lượt là 23,01 và 23,74%, khác biệt ý nghĩa với 4 dịch trích còn lại, tuy nhiên dịch trích MeOH của cây dã quỳ ở nồng độ này không có hiệu quả ức chế và dịch trích MeOH của cây cúc nhám lại gây kích thích 6,99% sự phát triển của thân cây cải bẹ xanh.

Bảng 1. Hiệu quả ức chế chiều dài thân cải bẹ xanh của dịch trích 6 loại cây họ cúc.

Thí nghiệm	Tỷ lệ ức chế (%)				Trung bình
	0,03 g/ml	0,1 g/ml	0,3 g/ml	1,0 g/ml	
Sao nháy	23,01 ^a	26,17 ^{bc}	52,22 ^a	97,54 ^a	48,56
Sài đất	26,80 ^a	32,41 ^b	32,60 ^d	76,01 ^b	41,28
Hướng dương	1,13 ^b	2,37 ^d	40,25 ^c	80,35 ^b	27,94
Dã quỳ	0 ^b	20,19 ^c	61,22 ^a	97,01 ^a	41,58
Vạn thọ	23,74 ^a	44,52 ^a	56,97 ^{ab}	91,12 ^a	53,37
Cúc nhám	-6,99 ^c	-17,78 ^c	32,17 ^d	91,26 ^a	16,71
Trung bình	10,08	14,72	45,67	90,47	
Ý nghĩa	**				
CV (%)	4,1				

Ghi chú: các giá trị trong cùng một cột có chữ cái đi kèm khác nhau biểu thị sự khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha=5\%$; **: khác biệt ý nghĩa 1%. Số liệu được chuyển sang dạng $\arcsin(\sqrt{(x/2+1)/100})$ khi thống kê và chuyển ngược lại khi trình bày. So sánh: nghiệm thức x nồng độ, $\text{LSD}_{5\%}=2,26$, $\text{LSD}_{1\%}=3,01$. Dấu “-” thể hiện tính kích thích thân cải bẹ xanh.



Hình 1. Ảnh hưởng của dịch trích MeOH của sao nháy (trái) và dã quỳ (phải) lên chiều dài thân và rễ cải bẹ xanh. Từ trái qua phải nồng độ lần lượt 0, 0,03, 0,1, 0,3 và 1 g/ml chất tươi.

Rễ cây cải bẹ xanh bị ức chế cao khi tiếp xúc với dịch trích MeOH của các cây vật liệu tại nồng độ 0,03 g/ml. Cây vạn thọ và sao nháy cho hiệu quả ức chế cao nhất (60,41 và 56,45%) và tỷ lệ thuận với nồng độ xử lý. Dịch trích MeOH của cây sài đất cho hiệu quả ức chế thấp nhất trên chiều dài rễ cây cải bẹ xanh một cách khác biệt có ý nghĩa thống kê ở nồng độ dịch trích là 0,3 g/ml (bảng 2). Tuy nhiên, ở nồng độ cao nhất (1,0 g/ml), dịch trích MeOH của cả 6 loài cây họ cúc đều gây ức chế cao đến sự tăng trưởng rễ của cải bẹ xanh và đạt từ 88,19 (hướng dương) đến 93,37% (sao nháy).

Bảng 2. Hiệu quả ức chế chiều dài rễ cải bẹ xanh của dịch trích 6 loại cây họ cúc.

Thí nghiệm	Tỷ lệ ức chế (%)				Trung bình thí nghiệm
	0,03 g/ml	0,1 g/ml	0,3 g/ml	1,0 g/ml	
Sao nháy	56,45 ^{ab}	63,94 ^b	76,15 ^b	93,37 ^a	74,20
Sài đất	51,61 ^b	52,01 ^c	54,82 ^c	90,24 ^a	61,70
Hướng dương	9,67 ^e	24,78 ^d	57,55 ^d	88,19 ^a	40,77
Dã quỳ	14,12 ^d	51,40 ^c	80,41 ^c	90,38 ^a	55,72
Vạn thọ	60,41 ^a	75,03 ^a	87,92 ^a	92,75 ^a	78,83
Cúc nhám	28,87 ^c	57,71 ^{bc}	79,14 ^{bc}	92,08 ^a	62,96
Trung bình	34,13	53,27	72,40	91,88	
Ý nghĩa	**				
CV (%)	4,5				

Ghi chú: các giá trị trong cùng một cột có chữ cái đi kèm khác nhau biểu thị sự khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha=5\%$; **: khác biệt ý nghĩa 1%. Số liệu được chuyển sang dạng $\arcsin(\sqrt{(x/2)/100})$ khi thống kê và chuyển ngược lại khi trình bày. So sánh: nghiệm thức x nồng độ, $\text{LSD}_{5\%}=2,49$, $\text{LSD}_{1\%}=3,32$.

Kết quả bảng 1 và 2 cho thấy, dịch trích MeOH từ các cây họ cúc thử nghiệm có tiềm năng chứa chất đối kháng cỏ dại và dịch trích MeOH của cây sao nháy có khả năng ức chế chiều dài thân cây cải bẹ xanh cao và ổn định nhất trong 6 loại cúc.

Ở nồng độ thấp nhất (0,03 g/ml), chiều dài rễ của cây cải bẹ xanh bị ức chế khi tiếp xúc với 6 loại dịch trích. Khả năng ức chế chiều dài thân và rễ của cây cải bẹ xanh gia tăng tỷ lệ thuận với nồng độ dịch trích. Trong nghiên cứu này, sao nháy và vạn thọ là hai cây cho khả năng ức chế cây cải bẹ xanh cao nhất (trên 30% với chiều dài thân và trên 75% với chiều dài rễ ở nồng độ 0,3 g/ml), chứng tỏ chúng có tiềm năng allelopathy trong 6 loại cây họ cúc.

Khả năng ức chế của dịch trích MeOH từ 6 loài cây họ cúc lên chiều dài thân và rễ cỏ lồng vực nước

Sau khi xác định cây cải bẹ xanh là loài mẫn cảm và dễ bị ức chế bởi dịch trích thực vật phù hợp với nghiên cứu trước kia [27], nghiên cứu tiếp tục tiến hành trên cây cỏ lồng vực nước tương tự như cây cải bẹ xanh. Bảng 3 và 4 cho thấy hiệu quả ức chế chiều dài thân và rễ của dịch trích MeOH cây sao nháy lên cỏ lồng vực nước đạt cao nhất và dịch trích MeOH của cây đã quỳ cho khả năng ức chế cỏ lồng vực nước gần tương đương với cây sao nháy (hình 2).

Bảng 3. Hiệu quả ức chế chiều dài thân cỏ lồng vực nước của dịch trích 6 loại cây họ cúc.

Thí nghiệm	Tỷ lệ ức chế (%)				Trung bình thí nghiệm
	0,03 g/ml	0,1 g/ml	0,3 g/ml	1,0 g/ml	
Sao nháy	8,50 ^a	22,32 ^a	54,23 ^a	88,15 ^a	42,25
Sải đất	4,87 ^a	4,76 ^b	8,19 ^c	74,44 ^b	21,41
Hướng dương	0,34 ^a	5,12 ^b	11,10 ^c	50,80 ^{cd}	15,79
Đã quỳ	2,28 ^a	11,39 ^{ab}	24,69 ^b	91,17 ^a	25,39
Vạn thọ	-26,69 ^c	-9,97 ^c	19,64 ^{bc}	62,96 ^{bc}	6,24
Cúc nhám	-8,69 ^b	5,46 ^b	10,25 ^c	42,59 ^d	11,19
Trung bình	-4,17	8,39	22,51	63,91	
Ý nghĩa	**				
CV (%)	6,9				

Ghi chú: các giá trị trong cùng một cột có chữ cái đi kèm khác nhau biểu thị sự khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha=5\%$; **: khác biệt ý nghĩa 1%. Số liệu được chuyển sang dạng $\arcsin(\sqrt{(x/2+1)/100})$ khi thống kê và chuyển ngược lại khi trình bày. So sánh thí nghiệm x nồng độ, $LSD5\%=3,6$, $LSD1\%=4,8$. Dấu “-” thể hiện sự kích thích thân cỏ lồng vực nước.

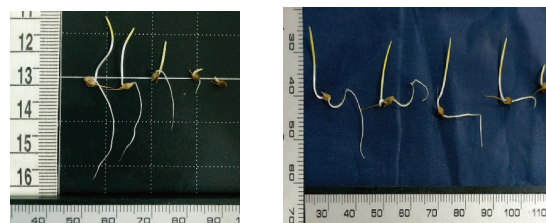
Bảng 4. Hiệu quả ức chế chiều dài rễ cỏ lồng vực nước của dịch trích 6 loại cây họ cúc.

Thí nghiệm	Tỷ lệ ức chế (%)				Trung bình thí nghiệm
	0,03 g/ml	0,1 g/ml	0,3 g/ml	1,0 g/ml	
Sao nháy	36,35 ^a	45,57 ^a	87,93 ^a	99,99 ^a	66,14
Sải đất	28,71 ^b	35,39 ^b	57,07 ^c	97,16 ^a	52,88
Hướng dương	4,04 ^c	11,94 ^c	34,72 ^c	79,47 ^b	27,51
Đã quỳ	21,94 ^c	37,15 ^b	68,66 ^b	99,99 ^a	51,98
Vạn thọ	-1,38 ^f	26,24 ^c	56,91 ^c	93,39 ^a	34,96
Cúc nhám	15,37 ^d	17,37 ^d	35,83 ^d	83,88 ^b	35,07
Trung bình	13,10	27,51	54,38	92,94	
Ý nghĩa	**				
CV (%)	5,5				

Ghi chú: các giá trị trong cùng một cột có chữ cái đi kèm khác nhau biểu thị sự khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha=5\%$; **: khác biệt ý nghĩa 1%. Số liệu được chuyển sang dạng $\arcsin(\sqrt{(x/2+1)/100})$ khi thống kê và chuyển ngược lại khi trình bày. So sánh thí nghiệm x nồng độ, $LSD5\%=2,58$, $LSD1\%=3,45$. Dấu “-” thể hiện kích thích trên rễ cỏ lồng vực nước.

Thân cỏ lồng vực nước ít chịu ảnh hưởng của dịch trích MeOH của các cây họ cúc ở nồng độ thấp (0,03 và 0,1 g/ml), thậm chí dịch trích MeOH của cây vạn thọ và cúc nhám còn gây kích thích sự phát triển thân của cỏ lồng vực nước ở nồng độ 0,03 g/ml với các giá trị tương ứng là 26,69 và 8,69%. Khi

nồng độ dịch trích tăng đến 0,3 và 1 g/ml, cây sao nháy cho hiệu quả ức chế 54,23 và 88,15% cao nhất và khác biệt ý nghĩa so với cây sải đất, hướng dương, vạn thọ, cúc nhám. Tuy nhiên, ở nồng độ 1,0 g/ml, dịch trích MeOH của cây đã quỳ đã ức chế 91,17% sự phát triển của thân cỏ lồng vực nước, khác biệt không có ý nghĩa thống kê với dịch trích MeOH của cây sao nháy (88,15%) (bảng 3, hình 2).



Hình 2. Ảnh hưởng của dịch trích MeOH của sao nháy (trái) và đã quỳ (phải) lên chiều dài thân và rễ cỏ lồng vực nước. Từ trái qua phải nồng độ lần lượt 0, 0,03, 0,1, 0,3 và 1 g/ml chất tươi.

Rễ cỏ lồng vực nước nhạy cảm hơn với dịch trích MeOH từ các cây họ cúc so với thân. Sử dụng dịch trích cây sao nháy nồng độ thấp (0,03 g/ml) ức chế cao nhất 36,35% chiều dài rễ. Khi nồng độ dịch trích tăng đến 0,3 g/ml, nó bắt đầu biểu hiện rõ hiệu suất ức chế chiều dài rễ cỏ lồng vực, trong đó dịch trích MeOH của cây sao nháy cho hiệu quả ức chế cao nhất 87,93%, khác biệt ý nghĩa so với dịch trích MeOH của 5 cây họ cúc còn lại. Nhìn chung, nồng độ dịch trích 1 g/ml ức chế rất cao chiều dài rễ cỏ lồng vực, dịch trích MeOH của cây sao nháy, đã quỳ (hình 2) ức chế gần 100% rễ cỏ lồng vực nước, khác biệt ý nghĩa với dịch trích cây hướng dương (79,47%) và cúc nhám (83,88%). Khả năng ức chế của dịch trích MeOH các loài cây họ cúc tỷ lệ thuận với nồng độ xử lý (bảng 4).

Chiều dài thân và rễ cỏ lồng vực nước bị dịch trích MeOH từ 6 loại cây họ cúc ức chế khi sử dụng nồng độ thấp và khả năng ức chế tăng dần khi nồng độ dịch trích tăng lên.

Nghiên cứu của Respatie và cs (2019) [5] đã cho thấy, dịch trích 40% (dung môi nước) của hoa sao nháy khô (*C. sulphureus*) có chứa hợp chất đối kháng thực vật, làm giảm chiều dài rễ và số lượng rễ cỏ cú (*Cyperus rotundus*). Mata và cs (2002) [12] khẳng định rằng, dịch trích từ rễ cây *C. pringlei* ức chế được cây cỏ lồng vực và cây rau họ dền (*A. hypochondriacus*), và từ đó phân lập được 3 hợp chất mới có khả năng ức chế 2 loại cỏ dại này. Trong đó, hợp chất dehydrocostus lactone có chỉ số $IC_{50}=1,3 \times 10^{-3}$ M đối với cỏ lồng vực nước. Điều đó chứng tỏ, hợp chất đối kháng cỏ lồng vực này có thể cũng được ly trích từ cây sao nháy là đối tượng trong nghiên cứu của chúng tôi. Ngoài cỏ cú và cây rau họ dền, dịch trích cây sao nháy còn ức chế một số loài cây khác như: lúa mì, cỏ ba lá, cỏ lúa mạch, cải bẹ xanh, cà chua Tomatillo và củ cải [21]. Như vậy, cho đến nay, sao nháy là cây có tiềm năng nghiên cứu allelopathy lớn.

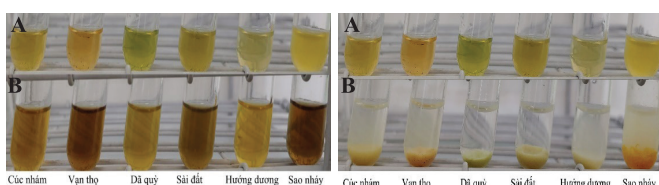
Ngoài cây sao nháy, các cây đã quỳ và sải đất cũng có tiềm năng allelopathy khá lớn. Điều đó từng được chứng minh bởi Oyerinde và cs (2009) [15] và Tongma và cs (1998) [28]. Trong đó, cây đã quỳ đã ức chế cây màn màn (*Cleome gynandra*), cây

đắp cá (*Raphanus sativus* L.), cây lúa (*Oryza sativa* L.) và cỏ chác (*Cyperus iria* L.); sài đất có thể ức chế tốt đối với nhiều loài cây như đậu xanh, dưa leo, cây củ cải [17], cây lúa [18] và cỏ gà, cỏ Bahia [19].

Tuy rằng hướng dương đã được chứng minh có khả năng allelopathy [29-32], nhưng trong nghiên cứu này tiềm năng allelopathy của nó thấp hơn so với các loài cây họ cúc khác, đặc biệt là sao nháy, dã quỳ và sài đất.

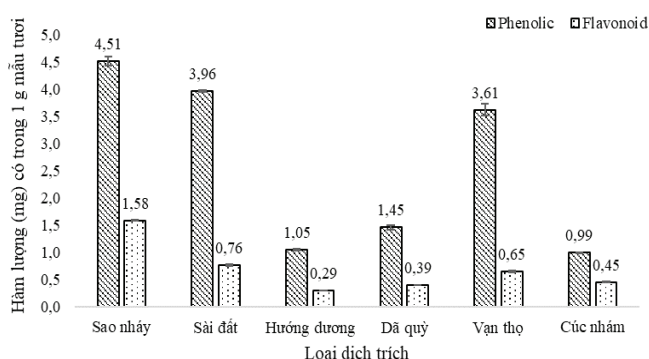
Định lượng hàm lượng phenolic tổng và flavonoid tổng từ dịch trích

Kết quả định tính cho thấy, dịch trích MeOH của 6 loài cây thử nghiệm (hình 3A và 4A) đều có chứa hợp chất phenolic và flavonoid (hình 3B và 4B).



Hình 3. Định tính phenolic (A: mẫu ban đầu, B: mẫu nhỏ thuốc thử). **Hình 4. Định tính flavonoid (A: mẫu ban đầu, B: mẫu nhỏ thuốc thử).**

Xây dựng đường chuẩn phenolic với chất chuẩn là axit gallic trong khoảng nồng độ từ 0,02 đến 0,12 (mg/ml) và đường chuẩn flavonoid với chất chuẩn quercetin trong khoảng nồng độ từ 0,02 đến 0,1 (mg/ml). Kết quả thu được 2 phương trình hồi quy tuyến tính tương ứng: $y = 5,2321x + 0,001$; $y = 7,6957x + 0,0038$ với hệ số tương quan $R=0,9994$ và $R=0,9962$. Dựa trên cơ sở hai đường chuẩn này, hàm lượng tổng phenolic, flavonoid, tỷ lệ flavonoid/phenolic trong các mẫu cây vật liệu được xác định và trình bày ở hình 5.



Hình 5. Hàm lượng phenolic tổng và flavonoid tổng của 6 loài cây họ cúc.

Kết quả hình 5 cho thấy, hàm lượng tổng phenolic và flavonoid trong dịch trích lớn nhất là 0,226 và 0,079 mg/ml trong 1 mg mô cây sao nháy tươi, từ đó suy ra được hàm tổng phenolic và flavonoid trong mô cây sao nháy tươi là 4,51 và 1,58 mg/g. Theo Respatie và cs (2019) [5], hàm lượng phenolic acid tổng trong hoa sao nháy khô là 155,4 μ g gallic acid/g, chỉ

bằng 1/29 so với cây tươi theo nghiên cứu này của chúng tôi. Điều đó chứng tỏ các bộ phận còn lại của cây sao nháy chứa hợp chất phenolic gấp nhiều lần trong hoa. Hàm lượng phenolic tổng từ dịch trích của lá cúc nhám là 143,17 μ g gallic acid/g chất khô [20], trong nghiên cứu của chúng tôi, hàm lượng này là 0,99 mg/g mô tươi. Từ các kết quả trên cho chúng ta thấy mỗi bộ phận của cây cho hàm lượng phenolic tổng khác nhau.

Nghiên cứu này chứng tỏ cả 6 loài cây họ cúc có thành phần chất chuyển hóa thứ cấp là flavonoid, phenolic và chúng có chứa axit gallic, chất gây ức chế sự nảy mầm của đậu Hà Lan (*Pisum sativum*) ở 1 mM [33]. Hợp chất phenolic ức chế khả năng phát triển của cây bằng cách thay đổi tính thấm của màng, qua đó ức chế khả năng hấp thu dinh dưỡng của cây và cuối cùng tác động lên quá trình sinh tổng hợp hormones nội sinh, chức năng và các hoạt động khác nhau của các enzyme, quá trình quang hợp, tổng hợp protein, phân chia và kéo dài tế bào thực vật [34]. Thêm vào đó, phenolic có thể làm giảm hàm lượng diệp lục bằng cách ức chế tổng hợp diệp lục tố hoặc phân hủy diệp lục tố [35]. Điều này giải thích tại sao hàm lượng phenolic tổng trong cây sao nháy cao đã ảnh hưởng đến khả năng ức chế của dịch trích MeOH của cây sao nháy lên cỏ lồng vực nước và cải bẹ xanh cao. Do đó, có thể sử dụng hợp chất này trong dịch trích cây họ cúc như một thành phần của thuốc diệt cỏ sinh học.

Hàm lượng flavonoid tổng trong dịch trích MeOH từ 6 loài cúc chiếm 18-45% so với tổng hàm lượng phenolic. Trong dịch trích cây sao nháy, hàm lượng phenolic tổng và flavonoid tổng cao vượt trội so với dịch trích từ những cây còn lại. Tuy nhiên, khả năng ức chế của dịch trích MeOH từ 6 loài cúc tại một số nồng độ không khác biệt ý nghĩa. Điều đó chứng tỏ khả năng ức chế của các loại dịch trích này còn có thể phụ thuộc vào sự đóng góp của một số hợp chất khác ngoài phenolic và flavonoid.

Kết luận

Dịch trích MeOH của 6 loài cúc: dã quỳ, sài đất, cúc nhám, hướng dương, sao nháy và vụn thò đều có chứa chất đối kháng thực vật.

Dịch trích MeOH từ cây sao nháy có khả năng ức chế thân và rễ cây cải bẹ xanh và cỏ lồng vực nước với hàm lượng phenolic tổng và flavonoid tổng cao hơn các loài cúc còn lại.

Hiệu quả ức chế của các loại dịch trích lên chiều dài thân và rễ mạnh hơn so với tác động lên chiều dài thân của cây cải bẹ xanh và cỏ lồng vực nước.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] M. Jasieniuk, et al. (1996), "The evolution and genetics of herbicide resistance in weeds", *Weed Science*, **44**, pp.176-193.
- [2] F. Matzenbacher, et al. (2015), "Distribution and analysis of the mechanisms of resistance of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) to imidazolinone and quinclorac herbicides", *The Journal of Agricultural Science*, **153**, pp.1044-1058.

- [3] G. Chen, et al. (2016), "Penoxsulam-resistant barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) in rice fields in China", *Weed Biology and Management*, **16**(1), pp.16-23.
- [4] D. Musyimi, et al. (2012), "Allelopathic effects of Mexican sunflower [*Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray] on germination and growth of spiderplant (*Cleome gynandra* L.)", *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences (JBES)*, **2**(8), pp.26-35.
- [5] D. Respatie, et al. (2019), "The potential of *Cosmos sulphureus* flower extract as a bioherbicide for *Cyperus rotundus*", *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, **20**(12), pp.3568-3574.
- [6] S.S. Narwal (1999), *Allelopathy in weed management*, Springer.
- [7] H.P. Bais, et al. (2004), "How plants communicate using the underground information superhighway", *Trends in Plant Science*, **9**(1), pp.26-32.
- [8] H.P. Bais, et al. (2006), "The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms", *Annual Review of Plant Biology*, **57**(1), pp.233-266.
- [9] G. Campbell, et al. (1982), "Allelopathic properties of α -terthienyl and phenylheptatriyne, naturally occurring compounds from species of Asteraceae", *Journal of Chemical Ecology*, **8**(6), pp.961-972.
- [10] I.S. Alsaadawi, et al. (2012), "Differential allelopathic potential of sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes on weeds and wheat (*Triticum aestivum* L.) crop", *Archives of Agronomy and Soil Science*, **58**(10), pp.1139-1148.
- [11] F.A. Macías, et al. (2002), "Bioactive terpenoids from sunflower leaves cv. Peredovick®", *Phytochemistry*, **61**(6), pp.687-692.
- [12] R. Mata, et al. (2002), "Sesquiterpene lactones and phenylpropanoids from *Cosmos pringlei*", *Journal of Natural Products*, **65**(7), pp.1030-1032.
- [13] G.R. Leather (1983), "Sunflowers (*Helianthus annuus*) are allelopathic to weeds". *Weed Science*, **31**, pp.37-42.
- [14] Z.Y. Ashrafi, et al. (2010), "Allelopathic potential of sunflower (*Helianthus annuus*) against seed germination in wild mustard (*Sinapis arvensis*) and foxtail (*Setaria viridis*)", *Indian Journal of Weed Science*, **42**, pp.82-87.
- [15] R. Oyerinde, et al. (2009), "Allelopathic effect of *Tithonia diversifolia* on the germination, growth and chlorophyll contents of maize (*Zea mays* L.)", *Scientific Research and Essay*, **4**(12), pp.1553-1558.
- [16] O. Ilori, et al. (2007), "Phytotoxic effects of *Tithonia diversifolia* on germination and growth of *Oryza sativa*", *Research Journal of Botany*, **2**(1), pp.23-32.
- [17] Z. Rensen, et al. (1994), *Studies on the allelopathic effects of wedelia chinensis aqueous extraction*.
- [18] C.R. Nie, et al. (2004), "Allelopathic potentials of *Wedelia trilobata* L. on rice", *Acta Agronomica Sinica*, **30**(9), pp.942-946.
- [19] H. Xu, et al. (2011), *Allelopathic effect of extracts from Wedelia trilobata on two turfgrass plants [J]*, Guangdong Agricultural Sciences.
- [20] H. Nawaz, et al. (2013), "Screening Faisalabad flora for allelopathic potential", *J. Sci. Res.*, **25**(1), pp.1-23.
- [21] C.L. Céspedes, et al. (2006), "Plant growth inhibitory activities by secondary metabolites isolated from Latin American flora", *Advances in Phytomedicine*, **2**, pp.373-410.
- [22] H.L. Thi, et al. (2014), "Isolation and purification of growth-inhibitors from Vietnamese rice cultivars", *Weed Biology and Management*, **14**(4), pp.221-231.
- [23] A. Sofowora (1993), "Screening plants for bioactive agents", *Medicinal Plants and Traditional Medicinal in Africa*.
- [24] P. Tiwari, et al. (2011), "Phytochemical screening and extraction: a review", *Internationale Pharmaceutica Scientia*, **1**(1), pp.98-106.
- [25] R. Yadav, M. Agarwala (2011), "Phytochemical analysis of some medicinal plants", *Journal of Phytology*, **3**, pp.10-14.
- [26] C.C. Chang, et al. (2002), "Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods", *Journal of Food and Drug Analysis*, **10**(3), DOI: 10.38212/2224-6614.2748.
- [27] M. Olofsson, et al. (2002), "Why phenolic acids are unlikely primary allelochemicals in rice", *Journal of Chemical Ecology*, **28**(1), pp.229-242.
- [28] S. Tongma, et al. (1998), "Allelopathic activity of Mexican sunflower (*Tithonia diversifolia*) in soil", *Weed Science*, **46**, pp.432-437.
- [29] M.M.A.S.K. Abeysekera, R.P. Robles (1993), "Comparative study of inhibitory effect of wild sunflower (*Tithonia diversifolia* (Hem SL.) Gray) and common sunflower (*Helianthus annuus* L.) on rice and *Echinochloa colona* (L.) Link", *Annual Scientific Meeting of the Pest Management*.
- [30] M. Cholid (2004), *Effect of incorporated common sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves on the growth of selected weeds and crops grown solely or in combination*.
- [31] R. Bogatek, et al. (2006), "Allelopathic effects of sunflower extracts on mustard seed germination and seedling growth", *Biologia Plantarum*, **50**(1), pp.156-158.
- [32] T. Anjum, R. Bajwa (2010), "Sunflower phytochemicals adversely affect wheat yield", *Nat. Prod. Res.*, **24**(9), pp.825-837.
- [33] Z.H. Li, et al. (2010), "Phenolics and plant allelopathy", *Molecules*, **15**(12), pp.8933-8952.
- [34] M.R. Abenavoli, et al. (2003), "Coumarin inhibits the growth of carrot (*Daucus carota* L. cv. Saint Valery) cells in suspension culture", *Journal of Plant Physiology*, **160**(3), pp.227-237.
- [35] C.M. Yang, et al. (2004), "Effects of three allelopathic phenolics on chlorophyll accumulation of rice (*Oryza sativa*) seedlings: II. Stimulation of consumption-orientation", *Bot. Bull. Acad. Sin.*, **45**, pp.119-125.

Nghiên cứu hoạt tính kháng nấm gây bệnh trên cam của chủng xạ khuẩn XK1 phân lập từ đất trồng cam

Trần Bảo Trâm¹, Nguyễn Thị Hiền¹, Trần Bình Minh¹, Nguyễn Thị Thùy Linh², Hoàng Thị Vân Anh², Thái Hạnh Dung², Trần Văn Tuấn², Vũ Xuân Tạo^{1*}

¹Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ

²Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Ngày nhận bài 22/2/2021; ngày chuyển phản biện 24/2/2021; ngày nhận phản biện 28/3/2021; ngày chấp nhận đăng 6/4/2021

Tóm tắt:

Xạ khuẩn *Streptomyces* được đánh giá là chi xạ khuẩn có tiềm năng trong việc tạo chế phẩm vi sinh dùng trong nông nghiệp do chúng an toàn và có khả năng đối kháng mạnh với nhiều loài vi khuẩn và vi nấm gây bệnh thực vật. Trong nghiên cứu này, 18 chủng xạ khuẩn đã được phân lập từ đất trồng cam tại tỉnh Hà Giang, trong đó chủng xạ khuẩn XK1 được đánh giá là có khả năng kháng mạnh với nấm *Penicillium digitatum* và *Colletotrichum gloeosporioides* gây thối và rụng quả cam. Dựa trên đặc điểm hình thái và trình tự 16S rRNA, chủng xạ khuẩn XK1 được xác định thuộc loài *Streptomyces albulus*. Trên môi trường MT2 với pH=6, sau 5 ngày nuôi lắc ở 30°C, dịch nuôi cấy chủng *S. albulus* XK1 thể hiện hoạt tính kháng *P. digitatum* và *C. gloeosporioides* mạnh nhất. Đồng thời, dịch nuôi cấy chủng *S. albulus* XK1 thể hiện hoạt tính ức chế khả năng gây bệnh của nấm *P. digitatum* trên cam. Như vậy, nghiên cứu này đã tuyển chọn được chủng xạ khuẩn *S. albulus* XK1 có khả năng kháng nấm *P. digitatum* và *C. gloeosporioides* mạnh và có tiềm năng ứng dụng trong việc sản xuất chế phẩm sinh học dùng trong phòng trừ bệnh thối và rụng quả trên cây cam.

Từ khóa: cây cam, *Colletotrichum gloeosporioides*, hoạt tính kháng nấm, *Penicillium digitatum*, xạ khuẩn.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Tại Việt Nam có nhiều vùng trồng cam nổi tiếng như Tuyên Quang, Hà Giang, Bắc Giang, Yên Bái... Trong những năm gần đây, diện tích và sản lượng cây có múi, trong đó đặc biệt là cây cam của cả nước tăng nhanh. Việc tăng nhanh diện tích trồng cây có múi cũng kèm theo diện tích bị sâu, dịch hại tăng mạnh. Trên cây có múi ở Việt Nam phát hiện được khoảng 40 loại bệnh hại, trong đó vi nấm là một trong số những đối tượng gây hại nghiêm trọng. Vi nấm gây bệnh có thể bùng phát thành dịch và gây tổn thất nặng nề cho ngành trồng cây có múi. *Penicillium digitatum* là nguyên nhân gây bệnh thối mốc xanh và rụng quả ở cây có múi. *P. digitatum* nhiễm qua vết xước trên vỏ quả do côn trùng hoặc tác nhân vật lý gây ra. Nếu nấm nhiễm vào quả ở giai đoạn trước khi thu hoạch thì sẽ gây hiện tượng thối và rụng quả. Bào tử nấm từ quả thối hỏng, có thể rơi xuống đất và được phát tán bởi gió nên dễ lây nhiễm tới các quả khác [1]. Nấm *Colletotrichum* cũng được ghi nhận là tác nhân gây rụng quả trên cây có múi. *C. gloeosporioides* chủ yếu gây bệnh thán thư [2], nhưng loài nấm này cũng được báo cáo là gây ra các triệu chứng bệnh ở giai đoạn trước khi thu hoạch như khô cành, khô cuống quả, thối cuống gây rụng quả [3, 4].

Hiện nay, để đặc trị các bệnh do vi nấm gây ra trên cây

có múi, người dân vẫn chủ yếu dùng các loại thuốc bảo vệ thực vật hóa học. Sử dụng nhiều loại hóa chất bảo vệ thực vật trong kiểm soát vi nấm gây hại đã để lại nhiều hậu quả cho sản xuất và môi trường. Do vậy, vấn đề nghiên cứu ứng dụng chế phẩm sinh học trong kiểm soát, phòng trừ vi nấm gây hại đang ngày càng được quan tâm trong chiến lược phát triển nông nghiệp bền vững. Xạ khuẩn được coi là tác nhân kiểm soát sinh học trong nông nghiệp với khả năng sinh nhiều hoạt chất được sử dụng để kiểm soát vi khuẩn và vi nấm gây bệnh thực vật [5]. Chúng có khả năng tiết các chất chuyển hóa thứ cấp ức chế sinh trưởng (như kháng sinh, độc tố, chất hoạt động bề mặt, chất dễ bay hơi) có thể ngăn chặn hoặc tiêu diệt vi sinh vật khác [6]. Các loài xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* được xem là nguồn sản xuất chất kháng sinh nhiều nhất [7]. Việc tìm kiếm các chủng xạ khuẩn có khả năng kháng *P. digitatum* và *C. gloeosporioides* phục vụ nghiên cứu sản xuất chế phẩm sinh học phòng trừ bệnh thối rụng quả trên cây cam sẽ góp phần xây dựng và phát triển ngành nông nghiệp an toàn và bền vững.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Chủng nấm *P. digitatum* và *C. gloeosporioides* gây bệnh thối rụng quả trên cây cam được cung cấp và lưu giữ tại

*Tác giả liên hệ: Email: taovx.tsa@gmail.com

Studying on the antifungal activity of the actinomycete XK1 isolated from growing orange's soil against pathogenic fungi causing disease in citrus

Bao Tram Tran¹, Thi Hien Nguyen¹, Binh Minh Tran¹,
Thi Thuy Linh Nguyen², Thi Van Anh Hoang²,
Hanh Dung Thai², Van Tuan Tran², Xuan Tao Vu^{1*}

¹Center of Experimental Biology, National Center for Technological Progress, Ministry of Science and Technology

²Key Laboratory of Enzyme and Protein Technology, University of Science, Vietnam National University, Hanoi

Received 22 February 2021; accepted 6 April 2021

Abstract:

Streptomyces are considered to be one of the actinomycetes genera having potential in the production of agricultural probiotics because they are safe and have strong antagonism to many bacterial and fungal species that cause plant diseases. In this study, 18 strains of actinomycetes were isolated from growing oranges' soil in Ha Giang province, of which the actinomycete strain XK1 was considered to be strongly resistant to the fungi *Penicillium digitatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* causing fruit rot and shedding in citrus. Based on morphological characteristics and 16S rRNA sequence, the strain XK1 was determined to belong to the *Streptomyces albulus*. On MT2 medium with pH=6, after five days of shaking cultivation at 30°C, the liquid cultures of *S. albulus* XK1 showed the strongest resisting activity to *P. digitatum* and *C. gloeosporioides*. At the same time, the broth cultures of *S. albulus* XK1 showed inhibitory activity against *P. digitatum* in oranges. The actinomycete strain *S. albulus* XK1 was selected base on strong antifungal ability against *P. digitatum* and *C. gloeosporioides* and had a potential for application in the production of probiotics used to control fruit rot and shedding in citrus.

Keywords: actinomycete, antifungal activity, *Colletotrichum gloeosporioides*, orange crops, *Penicillium digitatum*.

Classification number: 4.1

Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ.

Các mẫu đất vùng rễ cây cam khỏe mạnh được thu thập tại Hà Giang để phân lập các chủng xạ khuẩn.

Cam dùng cho nghiên cứu khả năng kháng nấm *P. digitatum* của dịch nuôi chủng xạ khuẩn XK1 là cam giống V2 trồng tại Hà Giang ở giai đoạn thu hoạch.

Thu mẫu đất

Thu mẫu đất vùng rễ của các cây cam khỏe mạnh, phát triển tốt. Mỗi điểm thu đào xuống từ mặt đất 10-15 cm và lấy khoảng 100 g đất xung quanh vùng rễ của cây. Mẫu được đựng trong túi polyetylen riêng biệt, ghi thời gian và địa điểm thu mẫu. Mẫu được bảo quản mát và được sử dụng để phân lập các chủng xạ khuẩn.

Phân lập xạ khuẩn

Các chủng xạ khuẩn được phân lập trên môi trường ISP4. Các mẫu đất được pha loãng bằng nước cất khử trùng đến các nồng độ khác nhau từ 10^{-1} đến 10^{-5} . Cây trái mẫu ở các nồng độ pha loãng trên môi trường ISP4. Các đĩa được ủ ở 28-30°C cho đến khi thu nhận các khuẩn lạc xạ khuẩn riêng rẽ [8].

Thu bào tử nấm

Các chủng nấm *P. digitatum* và *C. gloeosporioides* được nuôi cấy trên môi trường PDA 3-5 ngày ở 25-28°C để tiến hành thu bào tử. Quy trình thu bào tử được thực hiện theo Vu và cộng sự (2018) [9]. Dịch bào tử được xác định nồng độ bằng buồng đếm Thoma và pha loãng đến nồng độ thích hợp để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo. Dịch bào tử có thể được bảo quản ở 4°C để sử dụng trong 3-4 tuần hoặc giữ lâu dài trong glycerol 20% ở -30°C sau khi đã được làm đông trong nitơ lỏng.

Xác định hoạt tính kháng nấm bằng phương pháp đặt thỏi thạch và khuếch tán trên đĩa thạch

Với phương pháp đặt thỏi thạch dùng cho sàng lọc ban đầu, các chủng xạ khuẩn được nuôi trên môi trường ISP4 ở 30°C, sau 72 giờ đục những thỏi thạch có đường kính 9 mm đặt lên trên các đĩa đã được cấy trái 50 µl dịch bào tử các chủng nấm gây bệnh (10^6 bào tử/ml). Hoạt tính kháng nấm được tính bằng hiệu số đường kính vòng kháng nấm và đường kính thỏi thạch.

Với phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch, chủng xạ khuẩn được nuôi lắc trong môi trường dịch thể (lắc 200 vòng/phút) ở các điều kiện khác nhau (môi trường, thời gian, nhiệt độ, pH). Dịch nuôi xạ khuẩn được ly tâm 12000 vòng/phút trong 10 phút để thu phần dịch. Bổ sung 50 µl dịch thu được vào mỗi lỗ trên đĩa thạch PDA đã được cấy trái 50 µl dịch bào tử các chủng nấm gây bệnh (10^6 bào tử/ml). Các đĩa petri sau khi đặt thỏi thạch hoặc bổ sung dịch xạ khuẩn được nuôi ở 25°C trong thời gian 5-7 ngày và đo

đường kính vòng kháng nấm hình thành [10]. Hoạt tính kháng nấm được tính bằng hiệu số đường kính vòng kháng nấm và đường kính giếng thạch.

Định danh chủng xạ khuẩn XK1 thông qua đặc điểm hình thái và giải trình tự 16S rRNA

Hình thái và màu sắc khuẩn lạc của chủng xạ khuẩn XK1 được quan sát sau 5-6 ngày nuôi cấy trên môi trường ISP4 ở 30°C. Chủng xạ khuẩn XK1 được nuôi cấy trực tiếp trên tiêu bản kính hiển vi vô trùng có chứa môi trường ISP4. Tiêu bản được giữ trong hộp nhựa vô trùng có bổ sung giấy thấm và nước vô trùng để duy trì độ ẩm. Mẫu được ủ ở 30°C trong 4-5 ngày. Hình thái của hệ sợi và cuống sinh bào tử được quan sát dưới kính hiển vi [9]. Đồng thời, DNA tổng số của chủng XK1 được tách chiết theo quy trình nhóm nghiên cứu đã công bố [11]. Trình tự 16S rRNA được khuếch đại từ DNA tổng số bằng PCR sử dụng cặp mồi đa năng đặc hiệu cho phổ rộng các loài vi khuẩn gồm: mồi xuôi 63F: 5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3' và mồi ngược 1378R: 5'-GGGCGGWTGTACAAGGC-3' [12]. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 0,7% và tinh sạch bằng kit tinh sạch của hãng Promega (Mỹ). Mẫu DNA tinh sạch được giải trình tự bởi Công ty 1st BASE (Singapore) và trình tự 16S rRNA được phân tích so sánh với cơ sở dữ liệu của GenBank. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng bằng phần mềm MEGA6 [13].

Tối ưu điều kiện nuôi cấy chủng xạ khuẩn XK1 để đạt được hoạt tính kháng *P. digitatum* và *C. gloeosporioides* cao

Điều kiện nuôi cấy được tối ưu đối với chủng xạ khuẩn XK1 bằng cách so sánh hoạt tính kháng nấm của dịch nuôi cấy chủng xạ khuẩn XK1 ở các điều kiện khác nhau. Hoạt tính kháng nấm được xác định bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch [10]. Các điều kiện tối ưu bao gồm: môi trường dinh dưỡng (ISP4, SKS, MT301, 2M và MT2); thời gian nuôi cấy (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ngày); nhiệt độ nuôi cấy (25, 30 và 37°C); pH môi trường (5, 6, 7, 8). Thành phần các môi trường sử dụng trong nghiên cứu bao gồm: ISP4 (g/l: tinh bột-10; K₂HPO₄-1; MgSO₄-3; NaCl-5; (NH₄)₂SO₄-2; pepton-5; CaCO₃-2; FeSO₄-0,001475; MnCl₂-0,001; ZnSO₄-0,001835); SKS (g/l: tinh bột-10; glucose-10; bột đậu tương-10; peptone-5; CaCO₃-3); MT301 (g/l: tinh bột-24; glucose-1; peptone-3; cao thịt-3; cao nấm men-5; CaCO₃-4); 2M (g/l: tinh bột-20; bột đậu tương-15; cao nấm men-2; CaCO₃-4); MT2 (g/l: tinh bột-25; glucose-20; bột đậu tương-10; cao nấm men-10; NaCl-2; CaCO₃-5; MgSO₄-1).

Đánh giá khả năng kháng nấm *P. digitatum* trên cam của dịch nuôi cấy chủng xạ khuẩn XK1

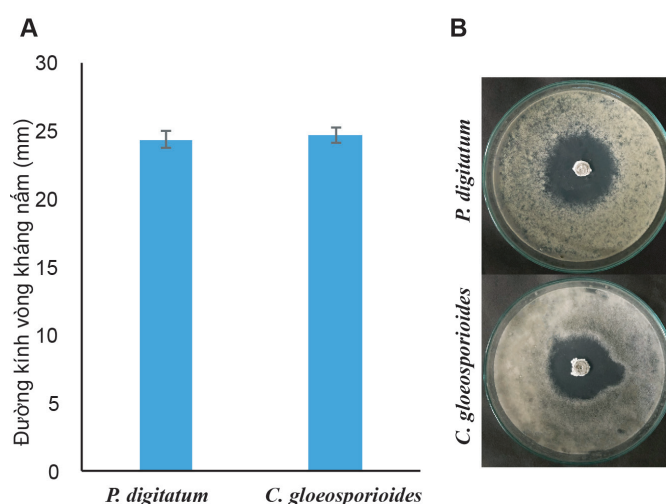
Quả cam được làm sạch bằng nước cất vô trùng và ethanol 70%, sau đó tạo vết thương xâm nhiễm bằng tăm vô trùng. Ở công thức thí nghiệm lây nhiễm nấm *P. digitatum*, cam được chia làm hai nhóm, một nhóm cam được ngâm

trong dịch nuôi cấy chủng xạ khuẩn XK1 (điều kiện nuôi theo kết quả nghiên cứu tối ưu) và một nhóm cam được ngâm trong nước cất vô trùng trong 30 phút và để khô tự nhiên, sau đó được lây nhiễm 10 µl dịch bào tử nấm *P. digitatum* (nồng độ 10⁶ bào tử/ml) [9]. Ở công thức đối chứng, hai nhóm cam được xử lý tương tự nhưng không tiến hành lây nhiễm nấm *P. digitatum*. Thí nghiệm được bố trí trong hộp kín vô trùng ở 25°C và quan sát sau 3, 5 và 7 ngày. Mỗi nhóm cam gồm 10 quả và mỗi công thức thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Kết quả và thảo luận

Phân lập và tuyển chọn chủng xạ khuẩn kháng nấm *P. digitatum* và *C. gloeosporioides*

Từ các mẫu đất thu tại vùng rễ các cây cam phát triển khỏe mạnh, chúng tôi đã phân lập được 18 chủng xạ khuẩn khác nhau. Đánh giá sơ bộ khả năng kháng nấm *P. digitatum* và *C. gloeosporioides* bằng phương pháp đặt thời thạch cho thấy, chủng xạ khuẩn XK1 thể hiện hoạt tính kháng mạnh đồng thời cả 2 loài nấm gây bệnh thối và rụng quả trên cây cam là *P. digitatum* và *C. gloeosporioides* (hình 1).



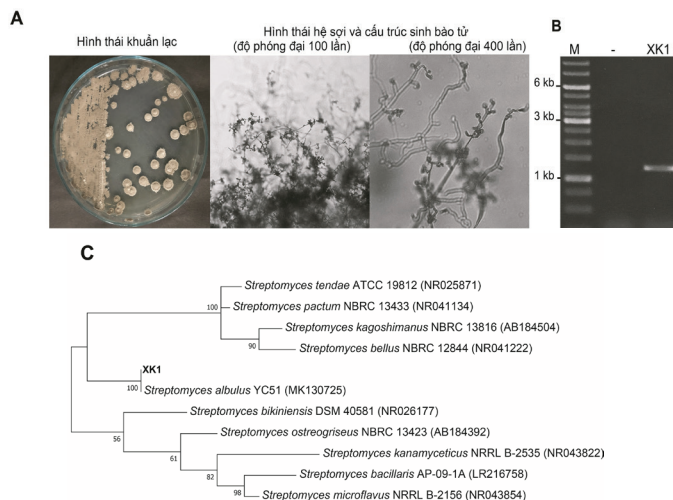
Hình 1. Khả năng kháng nấm *P. digitatum* và *C. gloeosporioides* của chủng xạ khuẩn XK1. (A) Đường kính vòng kháng nấm; (B) Vòng kháng nấm trên đĩa môi trường.

Trên thế giới, rất nhiều công trình khoa học đã đề cập tới khả năng kháng nấm bệnh thực vật của các chủng xạ khuẩn. Chủng xạ khuẩn *Streptomyces halstedii* AJ-7 được đánh giá có khả năng kiểm soát nấm *Phytophthora capsici* gây bệnh trên cây ớt đỏ [14] hay chủng xạ khuẩn *S. rhizosphaericus* 0250 có khả năng kháng mạnh nấm *Fusarium oxysporum* gây bệnh héo rũ ở cây mướp [15]. Xạ khuẩn *S. rochi* có khả năng đối kháng với nấm *P. capsici* gây bệnh thối rễ trên ớt với hiệu quả giảm bệnh lên đến 78,9% và ức chế sự phát triển của sợi nấm *P. capsici* trong điều kiện *in vitro* bằng cách tiết kháng sinh [16]. Chủng xạ khuẩn XK1 phân lập được trong nghiên cứu này có khả năng kháng mạnh với nấm gây bệnh trên cây

cam là *P. digitatum* và *C. gloeosporioides*. Do đó, chủng xạ khuẩn XK1 có tiềm năng phục vụ nghiên cứu sản xuất chế phẩm sinh học phòng trừ bệnh thối rụng quả trên cây cam.

Định danh chủng xạ khuẩn XK1

Để xác định an toàn sinh học và nhận biết chủng xạ khuẩn XK1 dùng cho nghiên cứu sản xuất chế phẩm vi sinh kiểm soát nấm *P. digitatum* và *C. gloeosporioides* gây bệnh trên cam, chúng tôi tiến hành định danh chủng XK1 nêu trên dựa trên đặc điểm hình thái và trình tự 16S rRNA. Đánh giá về đặc điểm khuẩn lạc cho thấy, chủng xạ khuẩn XK1 có khuẩn lạc lồi, bề mặt nhẵn, có các nếp, ban đầu có màu trắng sau chuyển sang màu xám, đường kính khuẩn lạc từ 3-5 mm sau 5 ngày nuôi cấy trên môi trường ISP4 ở 28-30°C. Quan sát dưới kính hiển vi cho thấy, khuẩn ty cơ chất đều phân nhánh mạnh và không bị đứt. Từ cuống sinh bào tử hình thành chuỗi bào tử dài có dạng xoắn móc câu, cong nhẹ ở đầu (hình 2A). Các đặc điểm này là những đặc điểm điển hình của chi xạ khuẩn *Streptomyces* [17].

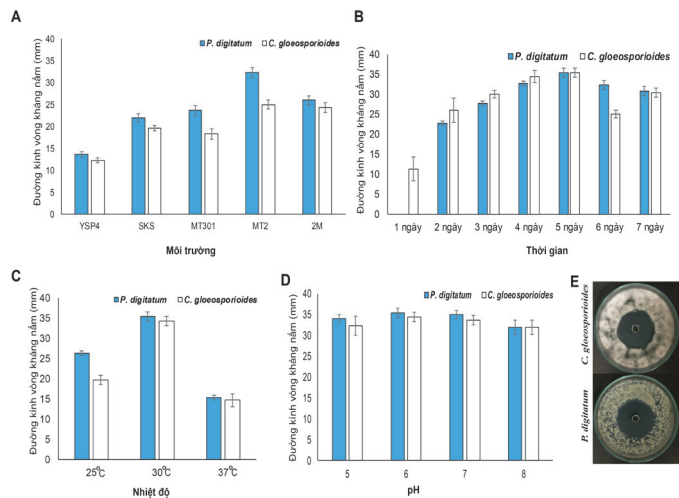


Hình 2. Định danh chủng xạ khuẩn XK1 dựa trên đặc điểm hình thái và trình tự 16S rRNA. (A) Hình thái chủng xạ khuẩn trên đĩa thạch YSP4 và dưới kính hiển vi; (B) Kết quả khuếch đại trình tự 16S rRNA; (C) Cây phát sinh loài dựa trên trình tự 16S rRNA; M: 1 kb DNA marker.

Để định danh chủng xạ khuẩn XK1, DNA tổng số của chủng xạ khuẩn XK1 được tách chiết để sử dụng cho phản ứng PCR khuếch đại 16S rRNA với cặp mồi 63F/1378R. Kết quả PCR cho thấy có một băng duy nhất kích thước khoảng 1300 bp (hình 2B). Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 0,7%, sau đó được tinh sạch bằng kit tinh sạch DNA của hãng Promega theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Mẫu DNA tinh sạch được giải trình tự bởi Công ty 1st BASE (Singapore). Kết quả so sánh trình tự 16S rRNA với dữ liệu trong GenBank và xây dựng cây phát sinh chủng loại sử dụng phần mềm MEGA6 [13] cho thấy, chủng xạ khuẩn XK1 thuộc loài *Streptomyces albulus* với độ tương đồng về trình tự 16S rRNA là 99% (hình 2C). Do vậy, chủng XK1 được xác định là *Streptomyces albulus* XK1.

Nghiên cứu điều kiện nuôi cấy tối ưu cho chủng xạ khuẩn *S. albulus* XK1

Môi trường dinh dưỡng, thời gian nuôi cấy, nhiệt độ và pH môi trường là các yếu tố quan trọng, ảnh hưởng tới hoạt tính kháng vi sinh vật của xạ khuẩn [18, 19]. Trong nghiên cứu này, các điều kiện nuôi cấy chủng xạ khuẩn XK1 được tối ưu nhằm thu được hoạt tính kháng nấm *P. digitatum* và *C. gloeosporioides* cao nhất. Kết quả tối ưu cho thấy, chủng xạ khuẩn XK1 được nuôi cấy trên môi trường MT2 với pH=6, sau 5 ngày nuôi ở nhiệt độ 30°C cho hoạt tính kháng đồng thời cả 2 loài nấm *P. digitatum* và *C. gloeosporioides* cao nhất (hình 3).

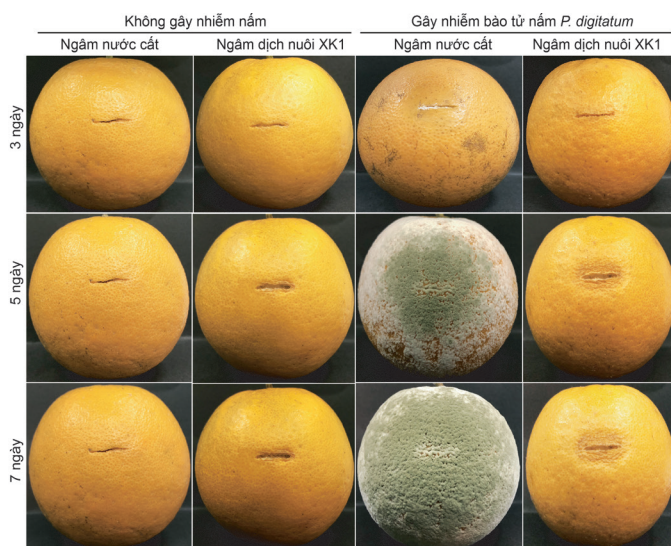


Hình 3. Kết quả nghiên cứu điều kiện nuôi cấy tối ưu cho chủng xạ khuẩn XK1. (A) Các loại môi trường dinh dưỡng; (B) Thời gian nuôi cấy; (C) Nhiệt độ nuôi cấy; (D) pH môi trường nuôi cấy; (E) Khả năng kháng nấm của dịch nuôi chủng xạ khuẩn ở điều kiện tối ưu.

Khả năng kháng nấm *P. digitatum* trên cam của dịch nuôi chủng xạ khuẩn XK1

Dịch nuôi chủng xạ khuẩn *S. albulus* XK1 được xác định có khả năng kháng mạnh nấm *P. digitatum*, tuy nhiên khả năng kháng nấm trên cam là kết quả quan trọng nhằm định hướng ứng dụng dịch nuôi chủng xạ khuẩn XK1 vào thực tế sản xuất chế phẩm sinh học. Kết quả nghiên cứu sau 3-7 ngày cho thấy, trên các mẫu cam được xử lý với nước cất và dịch nuôi chủng xạ khuẩn XK1 không lây nhiễm bào tử nấm *P. digitatum* không có hiện tượng bất thường, chứng tỏ nước cất và dịch nuôi chủng xạ khuẩn XK1 không làm ảnh hưởng tới cam. Trên mẫu cam được xử lý với nước cất và lây nhiễm bào tử nấm *P. digitatum*, cam bắt đầu xuất hiện hiện tượng thối hỏng sau 3 ngày, sau 5 ngày cam bị thối 50% bề mặt quả và sau 7 ngày cam đã bị thối toàn bộ bề mặt quả. Tuy nhiên, trên mẫu cam xử lý với dịch nuôi chủng xạ khuẩn XK1 không thấy xuất hiện hiện tượng thối hỏng (hình 4). Như vậy, có thể thấy, dịch nuôi chủng xạ khuẩn XK1 không chỉ kháng nấm *P. digitatum* trên đĩa thạch mà còn kháng mạnh khi thử nghiệm trên cam. Khả năng kháng nấm *P. digitatum* của dịch nuôi chủng xạ khuẩn XK1 có thể là do chủng xạ khuẩn này có khả năng sinh tổng

hợp các chất có hoạt tính sinh học như kháng sinh, độc tố, chất hoạt động bề mặt, chất dễ bay hơi, từ đó có thể ngăn chặn sự sinh trưởng hoặc tiêu diệt nấm bệnh [6, 7]. Hiện nay ở Việt Nam, các nghiên cứu sử dụng vi sinh vật để kiểm soát nấm *P. digitatum* gây bệnh trên cam chưa có nhiều. Trong khi đó, cam là một trong những cây trồng phổ biến và diện tích trồng ngày càng mở rộng. Dịch nuôi chủng xạ khuẩn XK1 có thể sử dụng cho sản xuất chế phẩm vi sinh kháng nấm *P. digitatum* gây bệnh trên cam.



Hình 4. Khả năng kháng nấm *P. digitatum* gây bệnh trên cam của dịch nuôi chủng xạ khuẩn XK1.

Kết luận

Nghiên cứu này đã tuyển chọn được chủng xạ khuẩn XK1 phân lập từ đất trồng cam tại tỉnh Hà Giang có hoạt tính kháng mạnh đồng thời cả 2 loài nấm *P. digitatum* và *C. gloeosporioides* gây thối và rụng quả cam. Dựa trên đặc điểm hình thái và trình tự 16S rRNA, chủng xạ khuẩn XK1 được xác định thuộc loài *Streptomyces albulus*. Điều kiện nuôi cấy tối ưu cho chủng *S. albulus* XK1 đạt hoạt tính kháng *P. digitatum* và *C. gloeosporioides* mạnh nhất gồm: môi trường MT2 với pH=6, thời gian nuôi 5 ngày ở 30°C. Dịch nuôi cấy chủng *S. albulus* XK1 thể hiện hoạt tính ức chế khả năng gây bệnh của nấm *P. digitatum* trên cam. Chủng xạ khuẩn *S. albulus* XK1 có tiềm năng ứng dụng trong việc sản xuất chế phẩm sinh học dùng cho kiểm soát vi nấm *P. digitatum* và *C. gloeosporioides* gây bệnh thối và rụng quả trên cây cam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S. Bautista-Baños (2014), *Postharvest Decay, Control Strategies*, Elsevier, pp.53-61.
- [2] D. Aiello, R. Carrieri, V. Guarnaccia, A. Vitale, E. Lahoz, G. Polizzi (2015), "Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. karstii* causing preharvest disease on *Citrus sinensis* in Italy", *Journal of Phytopathology*, **163**(3), pp.168-177.
- [3] H. Benyahia, A. Ifi-Jr, C. Smaili, M. Afellah, Y. Lamsetef, L. Timmer

(2003), "First report of *Colletotrichum gloeosporioides* causing withertip on twigs and tear stain on fruit of citrus in Morocco", *Plant Pathology*, **52**(6), pp.798-798.

[4] R. Kaur, H. Rewal, A. Sethi (2007), "Pre-harvest stem-end rot in citrus cultivars due to *Colletotrichum gloeosporioides*", *European Journal of Horticultural Science*, **72**(1), pp.20-25.

[5] S.D. Schrey, M.T. Tarkka (2008), "Friends and foes: streptomycetes as modulators of plant disease and symbiosis", *Antonie Van Leeuwenhoek*, **94**(1), pp.11-19.

[6] M.E. Hibbing, C. Fuqua, M.R. Parsek, S.B. Peterson (2010), "Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle", *Nature Reviews Microbiology*, **8**(1), pp.15-25.

[7] Z. Qin, K. Peng, X. Zhou, R. Liang, Q. Zhou, H. Chen, D.A. Hopwood, T. Kieser, Z. Deng (1994), "Development of a gene cloning system for *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *yingchengensis*, a producer of three useful antifungal compounds, by elimination of three barriers to DNA transfer", *Journal of Bacteriology*, **176**(7), pp.2090-2095.

[8] S.C. Hsu, J.L. Lockwood (1975), "Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil", *Applied Microbiology*, **29**(3), pp.422-426.

[9] T.X. Vu, T.T. Ngo, L.T.D. Mai, T.T. Bui, D.H. Le, H.T.V. Bui, H.Q. Nguyen, B.X. Ngo, V.T. Tran (2018), "A highly efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for the postharvest pathogen *Penicillium digitatum* using *DsRed* and *GFP* to visualize citrus host colonization", *Journal of Microbiological Methods*, **144**, pp.134-144.

[10] B. Intra, I. Mungsuntisuk, T. Nihira, Y. Igarashi, W. Panbangred (2011), "Identification of actinomycetes from plant rhizospheric soils with inhibitory activity against *Colletotrichum* spp., the causative agent of anthracnose disease", *BMC Research Notes*, **4**(1), pp.1-9.

[11] V.T. Tran, T.B.X.L. Do, T.K. Nguyen, X.T. Vu, B.N. Dao, H.H. Nguyen (2017), "A simple, efficient and universal method for the extraction of genomic DNA from bacteria, yeasts, molds and microalgae suitable for PCR-based applications", *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering*, **59**(4), pp.66-74.

[12] J.R. Marchesi, T. Sato, A.J. Weightman, T.A. Martin, J.C. Fry, S.J. Hiom, W.G. Wade (1998), "Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA", *Applied and Environmental Microbiology*, **64**(2), pp.795-799.

[13] K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar (2013), "MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0", *Molecular Biology and Evolution*, **30**(12), pp.2725-2729.

[14] G.J. Joo (2005), "Production of an anti-fungal substance for biological control of *Phytophthora capsici* causing phytophthora blight in red-peppers by *Streptomyces halstedii*", *Biotechnology Letters*, **27**(3), pp.201-205.

[15] X.F. Li, Y.H. Tian, H.Y. Peng, B.L. He, K.X. Gao (2020), "Isolation, screening and identification of antagonistic actinomycetes to control *Fusarium* wilt of *Momordica charantia*", *The Journal of Applied Ecology*, **31**(11), pp.3869-3879.

[16] M. Ezziyiani, M. Requena, C. Egea-Gilabert, M. Candela (2007), "Biological control of *Phytophthora* root rot of pepper using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in combination", *Journal of Phytopathology*, **155**(6), pp.342-349.

[17] Q. Li, X. Chen, Y. Jiang, C. Jiang (2016), *Morphological Identification of Actinobacteria, Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications*, Rijeka, Croatia: InTech, pp.59-86.

[18] H. Gao, M. Liu, J. Liu, H. Dai, X. Zhou, X. Liu, Y. Zhuo, W. Zhang, L. Zhang (2009), "Medium optimization for the production of avermectin B1a by *Streptomyces avermitilis* 14-12A using response surface methodology", *Bioresource Technology*, **100**(17), pp.4012-4016.

[19] M. Oskay (2011), "Effects of some environmental conditions on biomass and antimicrobial metabolite production by *Streptomyces* sp., KGG32", *International Journal of Agriculture & Biology*, **13**(3), pp.317-324.

Đánh giá khả năng sản xuất của ba tổ hợp lai gà bố mẹ

Phạm Thùy Linh, Nguyễn Quý Khiêm*, Đặng Đình Tứ, Nguyễn Trọng Thiện, Lê Ngọc Tân, Đào Thị Bích Loan, Vũ Quốc Dũng, Lê Văn Hùng, Nguyễn Thị Thu Hiền, Nguyễn Duy Trang

Trung tâm Nghiên cứu gia cầm Thụy Phương, Viện Chăn nuôi

Ngày nhận bài 18/11/2020; ngày chuyển phản biện 26/11/2020; ngày nhận phản biện 13/1/2021; ngày chấp nhận đăng 25/1/2021

Tóm tắt:

Nghiên cứu được thực hiện tại Trạm nghiên cứu chăn nuôi gà Phở Yên thuộc Trung tâm Nghiên cứu gia cầm Thụy Phương từ tháng 1/2019 đến tháng 8/2020 nhằm đánh giá khả năng sản xuất của các tổ hợp lai (THL) gà bố mẹ (♂TN1 x ♀TN2, ♂TN1 x ♀TN3, ♂TN1 x ♀TN32) và gà thương phẩm TN12, TN13, TN132. Kết quả cho thấy, 3 THL gà bố mẹ (♂TN1 x ♀TN2, ♂TN1 x ♀TN3, ♂TN1 x ♀TN32) có năng suất trứng/mái/68 tuần tuổi và tiêu tốn thức ăn (TTTÁ)/10 quả trứng lần lượt là 191,74 quả và 2,30 kg; 196,32 quả và 2,27 kg; 198,78 quả và 2,25 kg. Tỷ lệ phôi đạt lần lượt là 97,43, 97,07 và 97,67%. Gà thương phẩm TN12, TN13, TN132 có khối lượng cơ thể đến 8 tuần tuổi và TTTÁ/kg tăng khối lượng lần lượt là 2440,07 g và 2,29 kg; 2360,12 g và 2,26 kg; 2407,15 g và 2,22 kg.

Từ khóa: gà bố mẹ, khả năng sản xuất, tổ hợp lai.

Chỉ số phân loại: 4.2

Đặt vấn đề

Trong những năm gần đây, chăn nuôi gà đã và đang phát triển mạnh cả về số lượng và chất lượng, song song với chăn nuôi truyền thống thì chăn nuôi trang trại tập trung quy mô lớn cũng phát triển nhanh. Điều này đòi hỏi chúng ta phải luôn đẩy mạnh công tác giống như chọn tạo, chọn lọc các giống gà lông màu năng suất cao.

Chính vì vậy giai đoạn 2017-2020, Trung tâm Nghiên cứu gia cầm Thụy Phương đã được Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn giao chủ trì đề tài “Sản xuất thử nghiệm 3 THL gà bố mẹ từ 3 dòng gà lông màu VCN/TP-TN1 (viết tắt TN1), VCN/TP-TN2 (TN2) và VCN/TP-TN3 (TN3)”. Trong đó, dòng TN1 có khối lượng cơ thể 8 tuần tuổi gà trống đạt 2621,35 g, gà mái đạt 2203,86 g, năng suất trứng/64 tuần tuổi đạt 152,74 quả, tỷ lệ phôi đạt 96,12-96,84%, tỷ lệ nở/tổng trứng ấp đạt 82,06-82,68%. Dòng gà TN2 năng suất trứng/64 tuần tuổi đạt 180,46 quả, tỷ lệ phôi đạt 96,72-97,34%, tỷ lệ nở/tổng trứng ấp đạt 82,68-83,79%. Dòng gà TN3 năng suất trứng/64 tuần tuổi đạt 185,12 quả, tỷ lệ phôi đạt 96,72-97,34%, tỷ lệ nở/tổng trứng ấp đạt 82,74-83,54% [1].

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá khả năng sinh sản của gà bố mẹ (♂TN1 x ♀TN2, ♂TN1 x ♀TN3, ♂TN1 x ♀TN32); đánh giá khả năng cho thịt của gà thương phẩm TN12, TN13 và TN132.

*Tác giả liên hệ: Email: nguyenvuquykhiem64@gmail.com

Vật liệu, nội dung và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu, địa điểm và thời gian nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu: giống gà được chọn tạo từ bộ giống gà lông màu Hubbard Redbro và Sasso SA31L, gồm:

- Gà sinh sản bố mẹ: trống TN1, mái TN2, TN3 và TN32.
- Gà thương phẩm: TN1, TN2, TN3, TN12, TN13, TN32, TN132.

Địa điểm nghiên cứu: Trạm nghiên cứu chăn nuôi gà Phở Yên thuộc Trung tâm Nghiên cứu gia cầm Thụy Phương.

Thời gian nghiên cứu: từ tháng 1/2019 đến tháng 8/2020.

Nội dung nghiên cứu

- Nghiên cứu khả năng sinh sản của THL gà bố mẹ (♂TN1 x ♀TN2, ♂TN1 x ♀TN3, ♂TN1 x ♀TN32).
- Nghiên cứu khả năng sinh trưởng và cho thịt của gà TN1, TN2, TN3, TN12, TN13 và TN132.

Phương pháp nghiên cứu

Bố trí thí nghiệm:

Trên đàn gà sinh sản: sử dụng phương pháp phân lô theo mô hình một nhân tố ngẫu nhiên hoàn toàn (CRD) để đánh giá khả năng sinh sản, tỷ lệ phôi và TTTÁ/10 quả trứng của các THL gà bố mẹ. Lúc 20 tuần tuổi, THL bố trí 3 lô thí

Assessment of production capacity of three combinations of hybrid chickens

Thuy Linh Pham, Quy Khiem Nguyen*, Dinh Tu Dang, Trong Thien Nguyen, Ngoc Tan Le, Thi Bich Loan Dao, Quoc Dung Vu, Van Hung Le, Thi Thu Hien Nguyen, Duy Trang Nguyen

Thuy Phuong Poultry Research Center, NIAS

Received 18 November 2020; accepted 25 January 2021

Abstract:

The research was conducted at the Pho Yen Chicken Research Station, Thuy Phuong Poultry Research Center, from January 2019 to August 2020 to evaluate the productive ability of the combinations of hybrid parent hens (♂TN1 x ♀TN2, ♂TN1 x ♀TN3, ♂TN1 x ♀TN32) and commercial chicken TN12, TN13, TN132. The results achieved: 3 parent hen hybrid combinations (♂TN1 x ♀TN2, ♂TN1 x ♀TN3, ♂TN1 x ♀TN32) have the egg yield/hen/68 weeks of age and feed consumption/10 eggs are 191.74 eggs and 2.30 kg; 196.32 eggs and 2.27 kg; 198.78 eggs and 2.25 kg respectively. The rate of embryo reaches 97.43, 97.07, and 97.67%. The commercial chickens TN12, TN13, TN132 have the body weight at 8 weeks of age and feed consumption/kg body weight gain are 2440.07 and 2.29 kg; 2360.12 and 2.26 kg; and 2407.15 g and 2.22 kg respectively.

Keywords: hybrid combinations, parent hens, production capacity.

Classification number: 4.2

nghiệm, mỗi lô gồm 50 mái sinh sản, thí nghiệm lặp lại 3 lần. Sơ đồ bố trí thí nghiệm được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Sơ đồ bố trí thí nghiệm.

Diễn giải	DVT	THL 1 (♂TN1 x ♀TN2)	THL 2 (♂TN1 x ♀TN3)	THL 3 (♂TN1 x ♀TN32)
Số lượng gà 20 tuần tuổi	con	5♂ x 50♀	5♂ x 50♀	5♂ x 50♀
Số lần lặp lại	lần	3	3	3
Tổng số gà	con	15♂ x 150♀	15♂ x 150♀	15♂ x 150♀

Trên đàn gà thương phẩm: thí nghiệm nghiên cứu đánh giá ưu thế lai của gà thương phẩm TN12, TN13 và TN132, sử dụng phương pháp phân lô theo mô hình một nhân tố ngẫu nhiên hoàn toàn (CRD). Sơ đồ bố trí thí nghiệm như ở bảng 2.

Bảng 2. Sơ đồ bố trí thí nghiệm.

Chỉ tiêu	DVT	TN1	TN2	TN3	TN12	TN13	TN32	TN132
Số lượng gà 1 ngày tuổi	con	50	50	50	50	50	50	50
Số lần lặp lại	lần	3	3	3	3	3	3	3
Số gà thí nghiệm	con	150	150	150	150	150	150	150

Chế độ chăm sóc nuôi dưỡng sinh sản và thương phẩm được thực hiện theo quy trình chăm sóc nuôi dưỡng gà lông màu TN [2] (bảng 3 và 4).

Bảng 3. Giá trị dinh dưỡng nuôi gà sinh sản.

Chỉ tiêu	21-23 (tuần tuổi)	≥24 (tuần tuổi)
ME (kcal/kg thức ăn)	2750	2750
Protein thô (%)	16,00	17,00
Canxi (%)	2,50	3,43
Phot pho tổng số (%)	0,70	0,70
Methionine (%)	0,45	0,41
Lysine tổng số (%)	1,03	0,96

Ghi chú: ME là năng lượng trao đổi.

Bảng 4. Giá trị dinh dưỡng của thức ăn nuôi gà thương phẩm.

Chỉ tiêu	1-4 tuần tuổi	5-8 tuần tuổi
ME (kcal/kg thức ăn)	2900	3150
Protein thô (%)	20,00	18,00
Canxi (%)	1,00	1,00
Phot pho tổng số (%)	0,60	0,65
Methionine (%)	0,75	0,70
Lysine tổng số (%)	1,28	1,10

Các chỉ tiêu theo dõi:

Trên đàn gà sinh sản: tuổi đẻ 5%, khối lượng cơ thể và khối lượng trứng, TTTA/10 quả trứng, tỷ lệ đẻ, năng suất trứng, kết quả ấp nở.

Trên đàn gà thương phẩm: tỷ lệ nuôi sống; khả năng

sinh trưởng; hiệu quả sử dụng thức ăn; năng suất thịt; chỉ số sản xuất, chỉ số kinh tế; ưu thế lai về khối lượng cơ thể và TTTA.

Các chỉ tiêu theo dõi được tính toán theo phương pháp của Bùi Hữu Đoàn và cs (2011) [3].

Phương pháp xử lý số liệu: các số liệu thí nghiệm được xử lý thống kê bằng phần mềm Minitab phiên bản 16.0; xử lý thống kê ANOVA-GLM. Các kết quả thí nghiệm trình bày trong các bảng số liệu là giá trị trung bình $\pm$ sai số của số trung bình (SEM).

Kết quả nghiên cứu và thảo luận

Trên 3 THL gà bố mẹ

Tuổi thành thực sinh dục: kết quả bảng 5 cho thấy, tuổi đẻ 5% của gà thí nghiệm là 164-167 ngày. Khối lượng cơ thể của THL1, THL2, THL3 lúc đẻ đạt tỷ lệ 5% là 2630,67, 2612,89 và 2602,00 g; lúc 38 tuần tuổi khối lượng cơ thể gà THL1, THL2 và THL3 lần lượt là 2834,00, 2801,56 và 2816,89 g/con. Khối lượng trứng lúc đẻ đạt tỷ lệ 5% của cả 3 dòng gà trên là 50,06-50,27 g. Tại thời điểm 38 tuần tuổi, khối lượng trứng gà THL1 là 59,20 g; THL2 là 58,89 g và THL3 là 59,02 g. Sự sai khác về khối lượng cơ thể và khối lượng trứng lúc 38 tuần tuổi không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).

Bảng 5. Tuổi thành thực sinh dục, khối lượng cơ thể và khối lượng trứng (n=3).

Chỉ tiêu	THL 1 (♂TN1 x ♀TN2)	THL 2 (♂TN1 x ♀TN3)	THL 3 (♂TN1 x ♀TN32)	SEM	p
Tuổi đẻ 5% (ngày)	167	165	164		
Khối lượng cơ thể (g)					
Tuổi đẻ 5%	2630,67	2612,89	2602,00	16,800	0,191
38 tuần tuổi	2834,00	2801,56	2816,89	13,700	0,072
Khối lượng trứng (g)					
Tuổi đẻ 5%	50,27	50,12	50,06	0,463	0,857
38 tuần tuổi	59,20	58,89	59,02	0,282	0,444

Tỷ lệ đẻ, năng suất trứng và TTTA/10 quả trứng: kết quả bảng 6 cho thấy, gà bố mẹ TN có tỷ lệ đẻ cả giai đoạn thí nghiệm (24-68 tuần tuổi) cao nhất là THL3 (63,10%), tiếp đến là THL2 (62,32%) và thấp nhất là THL1 (60,87%). Năng suất trứng/mái/68 tuần tuổi và TTTA/10 quả trứng của THL1 là 191,74 quả và 2,30 kg; THL2 là 196,32 quả và 2,27 kg; THL3 là 198,78 và 2,25 kg. Có sự sai khác về năng suất trứng giữa các THL với $p<0,05$.

Theo Nguyễn Quý Khiêm và cs (2016) [2], năng suất trứng/mái/64 tuần tuổi của gà TN23 là 183,47 quả và TN32 là 184,02 quả. Kết quả nghiên cứu của Phùng Đức Tiến và cs (2009) [4] trên gà bố mẹ TP12 và TP21 cho biết năng suất trứng/mái/68 tuần tuổi là 183,83 và 183,03 quả. Như vậy, kết quả nghiên cứu này đạt cao hơn của các tác giả trên.

Bảng 6. Tỷ lệ đẻ, năng suất trứng và TTTA/10 trứng.

Tuần tuổi	THL1 (♂TN1 x ♀TN2)			THL2 (♂TN1 x ♀TN3)			THL3 (♂TN1 x ♀TN32)			NST cộng dồn (quả)	
	Tỷ lệ đẻ (%)	NST cộng dồn (quả)	TTTA/10 trứng (kg)	Tỷ lệ đẻ (%)	NST cộng dồn (quả)	TTTA/10 trứng (kg)	Tỷ lệ đẻ (%)	NST cộng dồn (quả)	TTTA/10 trứng (kg)	SEM	p
24-26	23,21	4,87 ^b	5,97	33,25	6,98 ^a	4,16	33,41	7,02 ^a	4,13	0,218	0,000
27-29	70,90	19,76 ^b	2,01	71,68	22,03 ^a	1,96	72,71	22,29 ^a	1,90	0,427	0,001
30-32	83,45	37,29 ^b	1,73	83,05	39,47 ^a	1,73	85,48	40,24 ^a	1,68	0,625	0,003
33-35	81,42	54,39 ^b	1,77	82,82	56,87 ^a	1,74	83,21	57,71 ^a	1,73	0,808	0,006
36-38	78,97	70,98 ^b	1,83	77,58	73,16 ^{ab}	1,85	78,24	74,14 ^a	1,84	1,018	0,022
39-41	72,99	86,31 ^b	1,93	74,56	88,82 ^{ab}	1,94	75,62	90,02 ^a	1,90	1,230	0,026
42-44	70,77	101,17 ^b	1,96	72,00	103,93 ^{ab}	2,00	71,53	105,04 ^a	2,01	1,400	0,036
45-47	65,45	114,92 ^b	2,12	67,89	118,19 ^{ab}	2,13	68,57	119,44 ^a	2,10	1,620	0,034
48-50	63,37	128,22 ^b	2,19	64,45	131,73 ^{ab}	2,24	64,27	132,94 ^a	2,24	1,830	0,046
51-53	60,72	140,98	2,28	61,30	144,60	2,35	61,74	145,90	2,33	2,010	0,056
54-56	57,43	153,03	2,42	57,03	156,58	2,53	57,63	158,00	2,50	2,210	0,078
57-59	53,64	164,30	2,59	54,97	168,12	2,53	54,54	169,46	2,61	2,390	0,087
60-62	49,96	174,79	2,78	50,55	178,74	2,75	51,91	180,36	2,67	2,500	0,080
63-65	45,99	184,45	3,02	46,65	188,53	2,98	48,41	190,52	2,86	2,490	0,061
66-68	34,72	191,74 ^b	4,01	37,09	196,32 ^{ab}	3,84	39,32	198,78 ^a	3,53	2,400	0,030
24-68	60,87	191,74 ^b	2,30	62,32	196,32 ^{ab}	2,27	63,10	198,78 ^a	2,25	2,400	0,030
Ưu thế lai							2,45	-1,53			

Ghi chú: NST: năng suất trứng.

Tỷ lệ phôi và kết quả ấp nở: qua theo dõi 6 lứa ấp (bảng 7) cho thấy, tỷ lệ trứng có phôi của THL1 là 97,43%; THL2 là 97,07%; THL3 là 97,67%. Sự sai khác về tỷ lệ phôi giữa các THL có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$). Tỷ lệ nở và tỷ lệ gà loại 1/tổng trứng ấp của THL1 là 83,84 và 82,16%; THL2 là 84,13 và 82,46%; THL3 là 84,77 và 83,06%. Không có sự sai khác về tỷ lệ nở và tỷ lệ gà loại 1/tổng trứng ấp giữa các THL ($p>0,05$). Theo nghiên cứu của Phùng Đức Tiến và cs (2009) [4] trên gà bố mẹ (gà trống TP4 x gà mái TP12, gà trống TP4 x gà mái TP21) tỷ lệ phôi đạt 96,17-96,27% và tỷ lệ gà loại 1/tổng trứng ấp đạt 82,23-83,39%, như vậy kết quả về tỷ lệ phôi trong nghiên cứu này đạt cao hơn, tỷ lệ gà loại 1/tổng trứng ấp là tương đương.

Bảng 7. Tỷ lệ phôi và kết quả ấp nở.

Chỉ tiêu	n (lứa)	THL1 (♂TN1 x TN2)	THL2 (♂TN1 x TN3)	THL3 (♂TN1 x TN32)	SEM	p
Tổng trứng (quả)		4048	4064	4385		
Tỷ lệ phôi (%)	6	97,43 ^{ab}	97,07 ^a	97,67 ^a	0,316	0,016
Tỷ lệ nở/tổng trứng ấp (%)	6	83,84	84,13	84,77	1,464	0,528
Tỷ lệ gà loại 1/tổng trứng ấp (%)	6	82,16	82,46	83,06	0,651	0,081

Trên đàn gà thương phẩm

Tỷ lệ nuôi sống: kết quả bảng 8 cho thấy, tỷ lệ nuôi sống đến 8 tuần tuổi của các con lai TN12, TN13 và TN132 đạt

96,00-98,00% và không có sự sai khác về tỷ lệ nuôi sống giữa các giống gà thí nghiệm ($p>0,05$). Kết quả này tương đương với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Quý Khiêm và cs (2016) [2] (tỷ lệ nuôi sống của gà TN32 đạt 96,00% và gà TN132 đạt 97,33%).

Bảng 8. Tỷ lệ nuôi sống qua các tuần tuổi (%) (n=3).

Tuần tuổi	TN1	TN2	TN3	TN32	TN12	TN13	TN132	SEM	p
1	100,00	100,00	98,67	99,33	99,33	99,33	100,00	0,873	0,463
2	100,00	99,33	98,00	98,67	98,67	98,00	99,33	0,873	0,109
3	99,33	98,67	98,00	98,67	98,67	98,00	98,67	0,976	0,908
4	99,33	98,67	96,67	98,00	98,67	97,33	98,67	1,069	0,188
5	98,00	98,00	96,00	98,00	98,00	96,67	98,00	0,976	0,123
6	97,33	97,33	96,00	97,33	97,33	96,67	98,00	0,976	0,306
7	97,33	97,33	96,00	96,00	97,33	96,67	98,00	0,756	0,206
8	97,33	96,67	96,00	96,00	96,00	96,67	98,00	1,155	0,227

Khả năng sinh trưởng của gà thí nghiệm: khối lượng cơ thể của các THL lúc 1 ngày tuổi (NT) trung bình 41,33-41,63 g/con. Đến 4 tuần tuổi khối lượng cơ thể có sự sai khác giữa các lô ($p<0,001$), đạt 898,87-953,40 g. Kết thúc thí nghiệm ở 8 tuần tuổi, khối lượng cơ thể của TN12 là 2440,07 g; TN132 là 2407,15 g; TN13 là 2360,12 g, ưu thế lai của gà lai TN12 là 4,34%, TN13 là 3,22% và TN132 là 3,38% (bảng 9).

Bảng 9. Khối lượng cơ thể gà thí nghiệm qua các tuần tuổi (g) (n=3).

Tuần tuổi	TN1	TN2	TN3	TN32	TN12	TN13	TN132	SEM	p
1 NT	41,63	41,33	41,52	41,61	41,59	41,49	41,50	0,348	0,948
1	137,27	134,07	136,91	134,13	136,10	139,52	136,83	2,320	0,134
2	324,92	325,37	325,82	321,94	327,14	325,24	323,83	3,640	0,720
3	606,55 ^a	591,29 ^{bc}	598,50 ^{ab}	589,84 ^{bc}	582,64 ^c	595,31 ^a	595,67 ^{ab}	4,070	0,000
4	953,40 ^a	898,87 ^c	944,98 ^{ab}	910,64 ^c	948,55 ^{ab}	935,17 ^b	942,91 ^{ab}	5,590	0,000
5	1348,44 ^a	1279,05 ^{bc}	1285,07 ^{bc}	1283,06 ^c	1324,42 ^b	1301,50 ^{cd}	1318,27 ^{bc}	6,560	0,000
6	1756,57 ^a	1625,08 ^d	1601,67 ^d	1647,35 ^c	1724,75 ^b	1702,06 ^b	1713,67 ^b	8,680	0,000
7	2138,90 ^a	1930,16 ^c	1871,11 ^c	1945,54 ^c	2093,57 ^b	2078,27 ^b	2088,03 ^b	8,560	0,000
8	2466,66 ^a	2210,39 ^c	2106,11 ^c	2190,07 ^c	2440,07 ^b	2360,12 ^c	2407,15 ^c	9,440	0,000
H (%)					4,34	3,22	3,38		

Ghi chú: theo hàng ngang các số mang các chữ cái khác nhau thì sự sai khác giữa các giá trị trung bình có ý nghĩa thống kê ở mức ($p<0,05$).

Kết quả nghiên cứu của Đào Thị Bích Loan và cs (2007) [5] trên con lai giữa gà Sasso X44 với gà TP1 lúc 8 tuần tuổi gà XTP1 đạt 2031,84 g. Theo Vũ Quốc Dũng (2012) [6], khối lượng cơ thể đến 8 tuần tuổi của con lai TN1 x TP2 là 2177,43 g/con và TN1 x LV2 là 2085,35 g/con. Phạm Thị Thanh Bình (2012) [7] cho biết, khối lượng cơ thể của gà lai TN1 x TP1 (TT11) và TN1 x TP3 (TT13) lúc 8 tuần tuổi là 2080,11 và 2174,88 g/con. Như vậy, gà lai TN12, TN13 và TN132 có các ưu điểm vượt trội hơn về khối lượng cơ thể lúc 8 tuần tuổi.

Hiệu quả sử dụng thức ăn: kết thúc thí nghiệm lúc 8 tuần

tuổi TTTĂ/kg tăng khối lượng cao nhất là gà TN12 (2,29 kg), tiếp theo lần lượt là TN13 (2,26 kg) và TN132 (2,22 kg). Có sự sai khác rõ rệt về TTTĂ/kg tăng khối lượng cơ thể ($p<0,001$). Ưu thế lai về hiệu quả sử dụng thức ăn của gà lai TN12, TN13 và TN132 đạt giá trị âm lần lượt là 2,55, 3,42 và 4,72% (bảng 10).

Bảng 10. TTTĂ/kg tăng khối lượng cơ thể (kg).

Tuần tuổi	TN1	TN2	TN3	TN32	TN12	TN13	TN132	SEM	p
1	1,57 ^a	1,54 ^a	1,36 ^a	1,55 ^a	1,61 ^a	1,51 ^{ab}	1,55 ^a	0,051	0,001
2	1,63 ^a	1,57 ^a	1,46 ^b	1,57 ^a	1,59 ^a	1,59 ^a	1,58 ^a	0,031	0,000
3	1,73 ^b	1,73 ^b	1,56 ^c	1,70 ^b	1,81 ^a	1,68 ^b	1,70 ^b	0,022	0,000
4	1,80 ^{ab}	1,83 ^a	1,61 ^c	1,74 ^{cd}	1,78 ^{bc}	1,73 ^{cd}	1,71 ^d	0,017	0,000
5	1,90 ^{ab}	1,93 ^a	1,72 ^c	1,85 ^c	1,89 ^b	1,81 ^d	1,83 ^{cd}	0,012	0,000
6	2,00 ^{bc}	2,06 ^a	1,91 ^c	1,97 ^{cd}	2,01 ^b	1,91 ^c	1,93 ^{de}	0,012	0,000
7	2,12 ^b	2,24 ^a	2,15 ^b	2,15 ^b	2,15 ^b	2,05 ^c	2,04 ^c	0,012	0,000
8	2,28 ^c	2,42 ^a	2,40 ^{ab}	2,38 ^b	2,29 ^c	2,26 ^c	2,22 ^d	0,016	0,000
Ưu thế lai (%)					-2,55	-3,42	-4,72		

Chỉ số sản xuất và chỉ số kinh tế: kết thúc thí nghiệm 8 tuần tuổi chỉ số sản xuất và chỉ số kinh tế của gà TN1 lần lượt là 187,93 và 8,47; TN2: 157,54 và 6,73; TN3: 150,40 và 6,55; TN32: 158,08 và 6,92; TN12: 182,66 và 8,31; TN13: 180,11 và 8,24; TN132: 191,41 và 8,80 (bảng 11). Chỉ số sản xuất và chỉ số kinh tế lúc 8 tuần tuổi có sự sai khác giữa các giống gà ($p<0,05$). Kết quả này cho thấy, đối với gà TN chỉ số sản xuất và chỉ số kinh tế giảm mạnh ở 8 tuần tuổi. Vì vậy, trong chăn nuôi gà TN thương phẩm nên giết mổ lúc 8 tuần tuổi sẽ mang lại hiệu quả kinh tế cho người chăn nuôi.

Bảng 11. Chỉ số sản xuất và chỉ số kinh tế.

Tuần tuổi	TN1	TN2	TN3	TN32	TN12	TN13	TN132	SEM	p
Chỉ số sản xuất (PN)									
1	125,08	124,36	141,61	123,10	120,31	131,42	126,01	17,580	0,980
2	142,64	146,61	156,73	144,84	144,43	143,18	145,55	17,400	0,943
3	165,70	160,86	179,57	162,68	150,20	165,07	164,71	19,650	0,902
4	188,04	173,32	202,92	182,77	186,98	187,67	194,65	21,480	0,800
5	199,00	185,88	205,04	194,15	195,08	198,84	201,17	22,490	0,670
6	203,60	183,14	191,36	194,11	197,65	205,06	206,83	20,440	0,124
7	200,26 ^a	171,40 ^b	170,68 ^b	177,25 ^b	192,46 ^{ab}	200,03 ^a	204,25 ^a	18,710	0,013
8	187,93 ^a	157,54 ^b	150,40 ^b	158,08 ^b	182,66 ^a	180,11 ^a	191,41 ^a	16,780	0,003
Chỉ số sản xuất (EN)									
1	7,98	8,07	10,39	7,96	7,49	8,72	7,89	1,419	0,893
2	8,77	9,31	10,77	9,25	9,11	9,01	8,95	1,236	0,998
3	9,57	9,31	11,55	9,55	8,30	9,81	9,41	1,263	0,851
4	10,45	9,48	12,62	10,48	10,53	10,83	11,07	1,315	0,863
5	10,60	9,78	12,14	10,65	10,50	11,15	10,82	1,328	0,901
6	10,37	9,11	10,31	10,13	10,11	10,98	10,67	1,086	0,161
7	9,67 ^{ab}	7,89 ^b	8,26 ^b	8,52 ^b	9,29 ^{ab}	10,05 ^a	10,04 ^a	0,910	0,006
8	8,47 ^a	6,73 ^b	6,55 ^b	6,92 ^b	8,31 ^a	8,24 ^a	8,80 ^a	0,735	0,005

Kết quả mổ khảo sát: kết quả mổ khảo sát tỷ lệ của các THL TN12, TN13 và TN132 lúc 8 tuần tuổi cho thấy, tỷ lệ thịt thân đạt lần lượt 75,63, 75,73 và 75,99%. Tỷ lệ thịt đùi + lườn đạt 48,00, 46,79 và 48,23% (bảng 12). Sự sai khác về tỷ lệ thịt đùi và tỷ lệ thịt lườn giữa các giống gà có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Kết quả nghiên cứu của Đoàn Xuân Trúc và cs (2004) [8] cho biết, tỷ lệ thịt thân và tỷ lệ thịt lườn + thịt đùi của gà Sasso đạt 74,59 và 37,68%; tỷ lệ thịt lườn + thịt đùi của gà ISA Color là 38,80%. Theo Nguyễn Thị Hải và cs (2008) [9], tỷ lệ thịt lườn + thịt đùi của gà Sasso đạt 37,07-39,62%. Như vậy, kết quả mổ khảo sát gà TN thương phẩm cao hơn so với một số giống gà lông màu hiện nay.

Bảng 12. Kết quả mổ khảo sát lúc 8 tuần tuổi (n=3).

Chỉ tiêu	TN1	TN2	TN3	TN32	TN12	TN13	TN132	SEM	p
Khối lượng sống (g)	2470,00 ^a	2220,00 ^a	2115,00 ^a	2215,00 ^b	2455,00 ^a	2383,33 ^a	2430,00 ^a	46,700	0,000
Tỷ lệ thịt thân (%)	75,84	75,30	75,18	75,24	75,63	75,73	75,99	0,367	0,090
Tỷ lệ thịt đùi (%)	24, ^{9a}	24,26 ^b	23,85 ^b	24,03 ^b	24,20 ^{ab}	23,96 ^a	24,43 ^{ab}	0,313	0,012
Tỷ lệ thịt lườn (%)	24,10 ^a	23,69 ^{ab}	23,06 ^{bc}	23,54 ^{abc}	23,80 ^{ab}	22,83 ^c	23,75 ^{ab}	0,285	0,001
Tỷ lệ đùi + lườn (%)	49, ^{9a}	47,96 ^{abc}	46,91 ^{bc}	47,57 ^{bc}	48,00 ^{bc}	46,79 ^c	48,23 ^{ab}	0,495	0,001
Tỷ lệ mỡ bụng (%)	1,39	1,34	1,43	1,37	1,38	1,37	1,35	0,034	0,078

Năng suất thịt/mái sinh sản/68 tuần tuổi: kết quả bảng 13 cho thấy, năng suất thịt/mái/68 tuần tuổi của THL3 (♂TN1 x ♀TN32) đạt cao nhất 363,29 kg, cao hơn THL1 (♂TN1 x ♀TN2) là 3,90%; THL2 (♂TN1 x ♀TN3) là 5,17%.

Bảng 13. Năng suất thịt/mái sinh sản/68 tuần tuổi.

Chỉ tiêu	ĐVT	♂TN1 x ♀TN2	♂TN1 x ♀TN3	♂TN1 x ♀TN32
* Năng suất sinh sản THL gà bố mẹ				
Năng suất trứng/mái/68 tuần tuổi	quả	191,74	196,32	198,78
Tỷ lệ chọn ấp	%	93,87	93,21	93,42
Tỷ lệ phôi	%	97,43	97,07	97,67
Gà con loại 1/mái	con	148	151	154
* Năng suất thịt gà thương phẩm				
Tỷ lệ nuôi sống	%	96,67	96,67	98,00
Khối lượng cơ thể 8 tuần tuổi	g	2440,07	2360,12	2407,15
Năng suất thịt/mái/68 tuần tuổi	kg	349,10	344,51	363,29
So sánh	%	96,10	94,83	100
Chênh lệch	%	-3,90	-5,17	

Kết luận

Kết quả nghiên cứu 3 THL gà bố mẹ cho thấy: i) THL1 (♂TN1 x ♀TN2) cho năng suất trứng/mái/68 tuần tuổi là 191,74 quả và TTTA/10 quả trứng là 2,30 kg; tỷ lệ phôi đạt 97,43%; tỷ lệ nở/tổng trứng ấp đạt 83,84%; tỷ lệ gà loại 1/tổng trứng ấp đạt 82,16%; ii) THL2 (♂TN1 x ♀TN3): năng suất trứng/mái/68 tuần tuổi là 196,32 quả và TTTA/10 quả trứng là 2,27 kg; tỷ lệ phôi đạt 97,07%; tỷ lệ nở/tổng trứng

ấp đạt 84,13%; tỷ lệ gà loại 1/tổng trứng ấp đạt 82,46%; iii) THL3 (♂TN1 x ♀TN32): năng suất trứng/mái/68 tuần tuổi là 198,78 quả và TTTA/10 quả trứng là 2,25 kg; tỷ lệ phôi đạt 97,67%; tỷ lệ nở/tổng trứng ấp đạt 84,77%; tỷ lệ gà loại 1/tổng trứng ấp đạt 83,06%.

Trên đàn gà thương phẩm: i) Gà thương phẩm TN12: khối lượng cơ thể đến 8 tuần tuổi đạt 2440,07 g; ưu thế lai là 4,34%; TTTA/kg tăng khối lượng là 2,29 kg; ii) Gà thương phẩm TN13: khối lượng cơ thể đến 8 tuần tuổi đạt 2360,12 g; ưu thế lai là 3,22%; TTTA/kg tăng khối lượng là 2,26 kg; iii) Gà thương phẩm TN132: khối lượng cơ thể đến 8 tuần tuổi đạt 2407,15 g; ưu thế lai là 3,43%; TTTA/kg tăng khối lượng là 2,22 kg.

Khả năng sản xuất thịt của 3 THL: năng suất thịt/mái/68 tuần tuổi của THL3 (♂TN1 x ♀TN32) đạt cao nhất 363,29 kg; tiếp đến là THL1 (♂TN1 x ♀TN2) đạt 349,10 kg; THL2 (♂TN1 x ♀TN3) đạt 344,51 kg. Năng suất thịt của THL3 cao hơn THL1 là 3,90% và THL2 là 5,17%.

Đề nghị công nhận THL gà bố mẹ (♂TN1 x ♀TN32) và con thương phẩm TN132 là tiến bộ kỹ thuật.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Phạm Thùy Linh, Nguyễn Quý Khiêm, Nguyễn Trọng Thiện, Đặng Đình Tứ, Lê Ngọc Tân, Vũ Quốc Dũng, Lê Văn Hùng, Nguyễn Thị Thu Hiền, Phạm Thị Lua (2020), *Kết quả chọn lọc ổn định năng suất ba dòng gà lông màu TN1, TN2 và TN3*, Báo cáo khoa học, Viện Chăn nuôi.
- [2] Nguyễn Quý Khiêm, Nguyễn Trọng Thiện, Phùng Đức Tiến, Lê Thị Nga, Hoàng Văn Lộc, Lê Thị Thu Hiền, Lê Ngọc Tân, Nguyễn Thị Nga, Đặng Đình Tứ (2016), *Báo cáo tổng hợp kết quả khoa học và công nghệ đề tài "Nghiên cứu chọn tạo một số dòng gà lông màu phục vụ chăn nuôi công nghiệp"*.
- [3] Bùi Hữu Đoàn, Nguyễn Thị Mai, Nguyễn Thanh Sơn, Nguyễn Huy Đạt (2011), *Các chỉ tiêu dùng trong nghiên cứu chăn nuôi gia cầm*, Nhà xuất bản Nông nghiệp.
- [4] Phùng Đức Tiến, Nguyễn Quý Khiêm, Lê Thị Thu Hiền, Nguyễn Thị Mười, Đào Thị Bích Loan, Phạm Thùy Linh (2009), *Chọn tạo 4 dòng gà lông màu hướng thịt TP1, TP2, TP3, TP4 qua 4 thế hệ*, Báo cáo khoa học, Viện Chăn nuôi.
- [5] Đào Thị Bích Loan (2007), *Nghiên cứu khả năng sinh sản của gà lai TP1 và khả năng cho thịt của tổ hợp lai giữa gà trống Sasso X44 với gà mái TP1*, Luận văn thạc sỹ nông nghiệp, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.
- [6] Vũ Quốc Dũng (2012), *Đánh giá khả năng sinh sản và cho thịt của hai tổ hợp lai giữa gà trống TN1 với gà mái TP2 và LV2*, Luận văn thạc sỹ nông nghiệp, Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Việt Nam.
- [7] Phạm Thị Thanh Bình (2012), *Đánh giá khả năng sinh sản và cho thịt của hai tổ hợp lai giữa gà trống TN1 với gà mái TP3*, Luận văn thạc sỹ nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam.
- [8] Đoàn Xuân Trúc, Nguyễn Văn Xuân, Nguyễn Thị Tiếp, Hoàng Văn Hải, Nguyễn Huy Đạt, Nguyễn Thành Đồng (2004), *Nghiên cứu khả năng sản xuất của gà ông bà và bố mẹ Sasso nuôi tại Xi nghiệp giống gà Tam Đảo và Trung tâm Nghiên cứu gia cầm Vạn Phúc*, Báo cáo khoa học, Viện Chăn nuôi.
- [9] Nguyễn Thị Hải, Trần Thanh Vân, Đoàn Xuân Trúc (2008), "Khảo nghiệm khả năng sản xuất của gà thương phẩm Sasso nuôi vụ thu đông tại Thái Nguyên", *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Chăn nuôi*, 2, tr.9-14.

Đa dạng thực vật cho lâm sản ngoài gỗ tại Khu bảo tồn thiên nhiên Đakrông, tỉnh Quảng Trị

Lê Tuấn Anh^{1*}, Trần Thị Hân¹, Phạm Thị Thúy Hoài¹, Hà Văn Bắc²

¹Trung tâm KH&CN Quảng Trị, Viện Nghiên cứu khoa học miền Trung

²Hạt Kiểm lâm Khu bảo tồn thiên nhiên Đakrông

Ngày nhận bài 1/2/2021; ngày chuyển phân biện 10/2/2021; ngày nhận phân biện 26/3/2021; ngày chấp nhận đăng 31/3/2021

Tóm tắt:

Nghiên cứu đa dạng thực vật cho lâm sản ngoài gỗ (LSNG) tại Khu bảo tồn thiên nhiên Đakrông, tỉnh Quảng Trị đã ghi nhận được 477 loài, 325 chi, 119 họ thuộc 5 ngành thực vật bậc cao có mạch, với ngành Ngọc Lan (Magnoliophyta) chiếm 96,01% tổng số loài. Có 10 họ đa dạng nhất về loài đã được xác định. Với nhiều giá trị sử dụng: cây lấy sợi 21 loài (4,40%), dược liệu 375 loài (78,62%), cây thực phẩm 74 loài (15,51%), cây cho tinh dầu 80 loài (16,77%), cây cảnh 124 loài (26,00%) và cây cho sản phẩm khác 36 loài (7,55%). Có 29 loài thuộc Sách đỏ Việt Nam (2007) và Nghị định 06/2019/NĐ-CP. Kết quả là cơ sở để Khu bảo tồn quản lý, sử dụng bền vững tài nguyên thực vật cho LSNG tại khu vực nghiên cứu.

Từ khóa: đa dạng thực vật lâm sản ngoài gỗ, Đakrông, khu bảo tồn, Quảng Trị.

Chỉ số phân loại: 4.4

Đặt vấn đề

Khu bảo tồn thiên nhiên (BTNN) Đakrông nằm về phía nam của huyện Đakrông, tỉnh Quảng Trị được thành lập theo Quyết định số 4343/2002/QĐ-UBND ngày 5/7/2002 với tổng diện tích hơn 37.600 ha. Khu vực này là điểm cuối dãy Trường Sơn Bắc, có tính đa dạng sinh học cao, phong phú và độc đáo, được Tổ chức bảo tồn chim quốc tế (Birdlife International) xếp vào vùng chim đặc hữu vùng địa hình đồi núi thấp Trung Bộ - 1 trong 4 vùng chim đặc hữu của Việt Nam; là nơi giao lưu giữa các luồng thực vật bắc nam, khu vực Đông Dương với tài nguyên LSNG rất phong phú. Nơi đây còn là khu vực sinh sống của đồng bào người Vân Kiều, Pa Cô với bản sắc văn hoá độc đáo, dồi dào về kho tàng văn hóa phi vật thể, phong tục tập quán của dân cư địa phương có ảnh hưởng đến chủng loại LSNG được khai thác. Tuy nhiên, đến nay vẫn chưa có tài liệu nào thống kê, đánh giá đầy đủ nguồn tài nguyên LSNG tại khu vực [1].

LSNG có vai trò rất quan trọng đối với công tác bảo vệ rừng, bảo tồn đa dạng sinh học và môi trường sinh thái. Tài nguyên LSNG tại Khu BTTN Đakrông cũng rất phong phú với nhiều giá trị sử dụng như cho sợi, dược liệu, thực phẩm, làm cảnh, đồ thủ công mỹ nghệ...

Xuất phát từ thực tiễn và những lý do nêu trên, đề tài “Đánh giá hiện trạng LSNG và đề xuất giải pháp khai thác, sử dụng bền vững tại Khu BTTN Đakrông, tỉnh Quảng Trị” được thực hiện nhằm kiểm kê nguồn LSNG tại Khu bảo tồn, đánh giá được thực trạng khai thác, sử dụng của người dân địa phương, từ đó tạo cơ sở cho các nhà quản lý có định hướng phát triển và bảo tồn phù hợp.

Phương pháp nghiên cứu

- Kế thừa các kết quả nghiên cứu đã có về LSNG tại Khu BTTN, gồm những ghi nhận về Danh lục thực vật cũ, các thông tin ghi chép của cán bộ kiểm lâm địa bàn..., đặc biệt là những kiến thức bản địa về LSNG của cộng đồng Vân Kiều tại Đakrông [2].

- Điều tra theo tuyến và thu mẫu theo Nguyễn Nghĩa Thìn (1997), với số lượng 5 tuyến theo sinh cảnh đặc trưng, mỗi tuyến có độ dài 3 km, phạm vi chiều ngang là 3 m [3].

- Sử dụng phương pháp đánh giá nhanh nông thôn (RRA) để đánh giá hiện trạng khai thác và buôn bán LSNG trong vùng đệm Khu BTTN bằng phiếu điều tra, phỏng vấn cán bộ Khu bảo tồn, cán bộ xã và người dân, mỗi nhóm 20 phiếu [4].

- Định loại tên khoa học dựa vào phương pháp so sánh hình thái theo tài liệu: Cây cỏ Việt Nam (Phạm Hoàng Hộ) [5], Thực vật chí Việt Nam (nhiều tác giả).

Chính lý tên khoa học theo <http://www.theplantlist.org> [6].

- Xác định các loài quý, hiếm, có nguy cơ tuyệt chủng theo Sách đỏ Việt Nam, Nghị định 06/2019/NĐ-CP của Chính phủ [7, 8].

Kết quả và thảo luận

Đa dạng về các taxon thực vật

Kết quả điều tra đã ghi nhận được 477 loài thực vật bậc cao có mạch tại khu vực nghiên cứu có khả năng cho LSNG, thuộc 119 họ, 325 chi. Các loài thực vật bậc cao có mạch tại khu vực nghiên cứu có ở tất cả các ngành thực vật: Lycopodiophyta,

* Tác giả liên hệ: Email: tasa207@gmail.com

Diversity of non timber forest products (NTFPs) extracted from Dakrong nature reserve, Quang Tri province

Tuan Anh Le^{1*}, Thi Han Tran¹, Thi Thuy Hoai Pham¹, Van Bac Ha²

¹Quang Tri Center of Science and Technology,

Mien Trung Institute for Scientific Research, VAST

²Forest Protection Department of Dakrong Nature Reserve, Quang Tri province

Received 1 February 2021; accepted 31 March 2021

Abstract:

Research on plant diversity for non-timber forest products (NTFPs) at Dakrong Nature Reserve, Quang Tri province. The study results have recorded 477 species, 325 genera, 119 families belonging to 5 vascular plant divisions, with Magnoliophyta accounting for 96.01% of the total number of species. The ten most diverse families of species have been identified. They are harvested from the forest to serve the lives of people and to sell. Useful plant resources comprise fibre plants 21 species (4.40%), medicinal plants 375 species (78.62%), foods plants 74 species (15.51%), aromatic plants 80 species (16.77%), ornament plants 124 species (26.00%), and plants for other products 36 species (7.55%). There are 29 species listed in the Vietnam Red Data Book (2007) and Decree 06/2019/ND-CP. The research results are the basis for the Dakrong Nature Reserve to manage and sustainably use plant resources for non-timber forest products in the study area.

Keywords: Dakrong, nature reserve, plant diversity non-timber forest products, Quang Tri province.

Classification number: 4.4

Polypodiophyta, Pinophyta, Gnetophyta và Magnoliophyta, trong đó ngành Magnoliophyta chiếm ưu thế với 458 loài (96,01%). Số lượng các bậc taxon phân bố được thống kê trong bảng 1.

Bảng 1. Thành phần thực vật cho LSNG phân bố ở các taxon.

TT	Ngành		Họ		Chi		Loài	
	Tên phổ thông	Tên khoa học	Số lượng	Tỷ lệ (%)	Số lượng	Tỷ lệ (%)	Số lượng	Tỷ lệ (%)
I	Họ Thông đất	Lycopodiophyta	2	1,68	2	0,62	2	0,42
II	Dương xỉ	Polypodiophyta	6	5,04	8	2,46	11	2,31
III	Hạt trần	Pinophyta	2	1,68	2	0,62	2	0,42
IV	Dây gấm	Gnetophyta	1	0,84	1	0,30	4	0,84
V	Hạt kín	Magnophyta	108	90,76	312	96,00	458	96,01
1	Lớp 2 lá mầm	Magnoliopsida	86	72,27	252	77,54	365	76,52
2	Lớp 1 lá mầm	Liliopsida	22	18,49	60	18,46	93	19,49
Tổng			119	100	325	100	477	100

Theo bảng 1, tỷ lệ loài giữa hai lớp Magnoliopsida và Liliopsida là 3,92:1, thể hiện tính chất thực vật nhiệt đới điển hình. Tuy nhiên, tỷ lệ này cho thấy số lượng cây hai lá mầm chiếm ưu thế hơn, với điều kiện khu vực có nhiều núi đá vôi và địa hình chia cắt, vào mùa khô rất ít khu vực có nước nên đây có thể là nguyên nhân cho sự chênh lệch này.

Bảng 2. Đa dạng về họ thực vật cho LSNG.

TT	Họ		Số lượng loài	Tỷ lệ (%)
	Tên Việt Nam	Tên khoa học		
1	Họ Thầu dầu	Euphorbiaceae	25	5,24
2	Họ Đậu	Fabaceae	23	4,82
3	Họ Cà phê	Rubiaceae	19	3,98
4	Họ Cúc	Asteraceae	16	3,35
5	Họ Cau	Arecaceae	15	3,14
6	Họ Cam quýt	Rutaceae	13	2,73
7	Họ Na	Annonaceae	12	2,52
8	Họ Trúc đào	Apocynaceae	12	2,52
9	Họ Hòa thảo	Poaceae	11	2,31
10	Họ gừng	Zingiberaceae	11	2,31
Tổng			157	32,91

Kết quả bảng 2 cho thấy, tại Khu BTTN có nhiều họ đa dạng về thành phần loài thực vật cho LSNG. Đặc biệt như các họ: Thầu dầu (Euphorbiaceae) có đến 25 loài (5,24%), thường được khai thác để làm dược liệu và rau ăn... Các họ khác như Đậu, Cà phê, Cúc, Cau... có số lượng loài lớn, được thống kê với 157 loài, chiếm 32,91% tổng số loài điều tra được.

Giá trị sử dụng của LSNG

Căn cứ vào kết quả điều tra hiện trường, kết hợp phỏng vấn chuyên gia và các tài liệu công bố liên quan về giá trị sử dụng, đề tài đã xác định được 6 nhóm thực vật cho LSNG ở Khu BTTN Đăkrông. Kết quả được tổng hợp có 710 lượt giá trị sử dụng của 477 loài (bảng 3).

Bảng 3. Thực vật cho LSNG theo giá trị sử dụng tại Khu BTTN Đakrông.

TT	Nhóm giá trị sử dụng	Số lượng loài	Tỷ lệ %*
1	Cây cho sản phẩm làm dược liệu (DI)	375	78,62
2	Cây cho sản phẩm thực phẩm (Ta)	74	15,51
3	Cây làm cảnh, bóng mát (Cb)	124	26,00
4	Cây cho sản phẩm có sợi (S)	21	4,40
5	Cây cho sản phẩm chiết xuất (Cs)	80	16,77
6	Cây cho sản phẩm khác (Ck)	36	7,55
Tổng cộng		710	

*: xét trên tổng số loài ghi nhận được (477 loài).

Nhóm cây dược liệu: kết quả bảng 3 cho thấy, nhóm cây dược liệu có 375 loài, chiếm tỷ lệ lớn nhất (78,62%). Công dụng chữa bệnh khá đa dạng, từ những bệnh cảm mạo thông thường đến những bệnh nan y. Tuy nhiên, việc sử dụng cây thuốc của đồng bào chủ yếu đơn loài và thông tin ít, không được chia sẻ nhiều, khó lưu truyền cho thế hệ sau. Một số loài dược liệu quý có thể kể đến như: Ba gạc vòng (*R. verticillata*), Màng tang (*Litsea cubeba*), Lan kim tuyến (*Anoetochilus setaceus*)...

Nhóm cây thực phẩm: có khoảng 74 loài, chiếm 15,51% tổng số loài LSNG. Các loài cho sản phẩm (lá, hoa, quả...) ăn được có vị ngon như: Lỗ ô (*Bambusa balcoa*), Rau má (*Centella asiatica*), Rau sắng (*Strophoblachia fimbriatylx*), Bắp chuối (*Musa acuminata*)...

Nhóm cây làm cảnh, bóng mát: gồm 124 loài, chiếm 26,00% tổng số loài LSNG. Nhiều loài cho hoa đẹp như Phong lan, Cẩm cù (*Hoya*), Thu hải đường (*Begonia* spp.). Đặc biệt, loài Cẩm cù đá (*Hoya crassipetiolata*) (hình 1) và Cẩm cù lâm thành (*H. lamthanhae*) (hình 2) mới được phát hiện ở các hốc núi đá vôi trong khu vực. Hai loài này có hoa đẹp và có giá trị làm cảnh trên thị trường. Chúng tôi đề nghị bổ sung vào danh lục thực vật của Khu BTTN Đakrông.



Hình 1. Cẩm cù đá (*Hoya crassipetiolata*)



Hình 2. Cẩm cù lâm thành (*H. lamthanhae*)

Nhóm cây cho sợi: gồm 21 loài, chiếm 4,40% tổng số loài LSNG được điều tra. Nhóm cây này được nhân dân sử dụng với các mục đích đa dạng: đan lát thủ công và các công việc hữu ích khác, gồm các loài: tre (*Bambusa balcoa* Roxb.), Mây bột

(*Calamus poilanei* Conr.), Lá nón (*Licuala bracteata*) dùng sản xuất nón lá truyền thống...

Nhóm cây cho tinh dầu, nhựa: các loài cung cấp nguyên liệu ép dầu, dầu ăn, tinh dầu, nhựa... có khoảng 80 loài, chiếm 16,77%, gồm Bời lời chanh (*Litsea cubeba* (Lour.) Pers.), Vù hương (*Cinamomum parthenoxylon*) có tinh dầu rất thơm, Riềng gió (*Zingiber zerumbet*)...

Nhóm cây cho sản phẩm khác: gồm khoảng 36 loài, chiếm 7,55% tổng số loài LSNG. Nhóm cây này được nhân dân sử dụng với các mục đích đa dạng phục vụ nhu cầu cuộc sống như cây gỗ chuồn (*Calophyllum* sp.) và cây đoác (*Arenga pinnata*) dùng để sản xuất rượu cần..., lau (*Erianthus arundinaceus*), sậy (*Phragmites valleria*)... dùng để làm chổi, đồ thủ công.

Thực vật cho LSNG ở Khu BTTN Đakrông rất phong phú, đa dạng về giá trị sử dụng. Trong đó, nhóm cho sản phẩm dược liệu và nhóm cây cảnh, cho bóng mát phục vụ tốt cho việc tạo cảnh quan và chống sạt lở tại địa phương. Giá trị dược liệu chưa được khai thác tốt, chỉ sử dụng tập trung một số loại như Lá khô, Lan kim tuyến, ... dẫn đến hiện tượng cạn kiệt trong tự nhiên, cần có biện pháp quản lý, khai thác phù hợp hơn.

Phân loại cây LSNG theo dạng sống thực vật

Bảng 4. Dạng sống thực vật cho LSNG.

TT	Dạng sống	Số lượng	Tỷ lệ (%)
1	Cây gỗ	126	26,42
2	Cây bụi	123	25,79
3	Cây dây leo	106	22,22
4	Cây thân thảo	104	21,80
5	Ký sinh/phụ sinh	18	3,77
Tổng		477	100

Kết quả bảng 4 cho thấy, trong các dạng sống của thực vật LSNG ở Khu BTTN Đakrông, dạng cây gỗ chỉ có 126 loài (chiếm 26,42%), các dạng còn lại có số lượng khá lớn, đặc biệt dạng thân thảo có 104 loài (chiếm 21,80%), cây bụi 123 loài (chiếm 25,79%). Như vậy có thể thấy cây LSNG ở đây chủ yếu thuộc dạng cây bụi, dây leo và cây thân thảo, điều này rất thuận lợi cho phát triển LSNG do chúng có thời gian sinh trưởng ngắn và dễ thu nguyên liệu, giúp cải thiện sinh kế nhanh và bền vững hơn, không tác động nhiều đến những loài cây gỗ có kích thước lớn.

Đa dạng về nguồn gen quý hiếm

Căn cứ vào Sách đỏ Việt Nam (2007) và Nghị định 06/2019/NĐ-CP ngày 22/1/2019 của Chính phủ kết hợp với kết quả điều tra thực tế, đề tài đã ghi nhận được 29 loài thực vật quý hiếm cần được ưu tiên bảo tồn tại khu vực nghiên cứu. Trong đó có 13 loài trong Sách đỏ Việt Nam (2007) và 20 loài thuộc Nghị định 06/2019/NĐ-CP [7, 8].

Bảng 5. Danh lục các loài LSNG tại Khu BTTN Đakrông có giá trị bảo tồn.

TT	Tên khoa học	Tên Việt Nam	Sách đỏ Việt Nam 2007	Nghị định 06/2019/NĐ-CP
1	<i>Cycas immissa</i> Craib.	Thiên tuế chìm		IIA
2	<i>Drynaria bonii</i>	Tắc kè đá		IIA
3	<i>Ixodonerium annamense</i> Pit	Néo	VU	
4	<i>Rauvolfia verticillata</i> (Lour.) Baill.	Ba gạc lá vòng	VU	
5	<i>Rauvolfia cambodiana</i> Pierre ex Pitar	Ba gạc cầm bột	VU	
6	<i>Garcinia fagraeoides</i> A. Chev.	Trái lý		IIA
7	<i>Sindora siamensis</i> Teyss. ex Miq.	Gỗ mật	EN	IIA
8	<i>Cinnamomum parthenoxylon</i> (Jack.)	Xá xị	CR	
9	<i>Cinnamomum glaucescens</i> (Buch. Hamilt.) Drury	Re hương		IIA
10	<i>Coscinium fenestratum</i> (Gaertn.) Colebr.	Vàng đắng		IIA
11	<i>Fibraurea tinctoria</i> Lour	Hoàng đằng		IIA
12	<i>Stephania japonica</i> (Thunb.) Miers.	Bình vôi nhật		IIA
13	<i>Stephania glabra</i>	Bình vôi		IIA
14	<i>Ardisia silvestris</i> Pitar	Lá khôi tía	VU	
15	<i>Melientha suavis</i> Pierre	Rau sắng	VU	
16	<i>Kadsura roxburghiana</i> Arnott.	Sun xe trung bộ		IIA
17	<i>Murraya glabra</i> (Guillaum.) Guillaum.	Vương tùng	VU	
18	<i>Aquilaria crassna</i> Pierre ex Lecomte	Trầm hương	EN	
19	<i>Anoectochilus setaceus</i> Blume	Kim tuyến	EN	IA
20	<i>Calamus poilanei</i> Conr.	Mây bột	EN	IIA
21	<i>Tacca intergrifolia</i> Ker.-Gawl.	Hạ túc	VU	
22	<i>Dendrobium amabile</i> (Lour.) O'brien	Thủy tiên hương	EN	IIA
23	<i>Aerides falcata</i> Lindl.	Giáp hương		IIA
24	<i>Arundina graminifolia</i> (D.Don) Hochr.	Sậy lan		IIA
25	<i>Bulbophyllum mastersianum</i>	Lan lọng		IIA
26	<i>Cymbidium banaense</i> Gagn.	Đoàn kiếm		IIA
27	<i>Cymbidium dayanum</i>	Bích ngọc		IIA
28	<i>Cymbidium finlaysonianum</i>	Đoàn kiếm finlayson		IIA
29	<i>Dendrobium crystallinum</i> Reichb.f.	Ngọc vụn		IIA

Kết quả thống kê ở bảng 5 là cơ sở giúp Khu BTTN có chiến lược bảo tồn và phát triển bền vững nguồn tài nguyên thực vật cho LSNG nơi đây. Đặc biệt, theo quy định mới, tất cả các loài lan đều thuộc phạm vi cấm khai thác, có 8 loài lan thuộc danh lục này được

ghi nhận tại Đakrông. Số lượng nhiều các loài cây nguy cấp và quý hiếm trong danh lục cây LSNG là tiềm năng của Khu BTTN Đakrông, nhưng cũng chính là những thách thức đối với các nhà quản lý. Cần có chế tài phù hợp để thực hiện tốt Nghị định này, bảo tồn được các loài lan rừng [7, 8].

Kết luận

Tại Khu BTTN Đakrông, tỉnh Quảng Trị đã điều tra được 477 loài thực vật cho LSNG, thuộc 119 họ, 325 chi thực vật bậc cao có mạch. Thực vật LSNG được chia thành 6 nhóm công dụng, với ưu thế của nhóm cây dược liệu. Trong đó có 29 loài thuộc Sách đỏ Việt Nam (2007) và Nghị định 06/2019/NĐ-CP cần được bảo vệ.

LSNG chủ yếu là dạng thân thảo với 104 loài (chiếm 21,80%), cây bụi với 123 loài (chiếm 25,79%), điều này rất thuận lợi cho phát triển LSNG tại địa phương.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn Quảng Trị (2020), *Báo cáo Quy hoạch bảo tồn và phát triển bền vững Khu BTTN Đakrông đến năm 2020, định hướng đến năm 2030*.
- [2] Hàn Tuyết Mai (2012), *Kiến thức bản địa trong quản lý và sử dụng thực vật lâm sản ngoài gỗ của cộng đồng người Vân Kiều ở thôn Là Tó, xã Húc Nghi, huyện Đakrông, tỉnh Quảng Trị*, Trung tâm Nghiên cứu Tài nguyên và Môi trường, Đại học Quốc gia Hà Nội.
- [3] Nguyễn Nghĩa Thìn (1997), *Cẩm nang nghiên cứu đa dạng sinh vật*, Nhà xuất bản Nông nghiệp.
- [4] J.M. Gary (2002), *Thực vật dân tộc học*, Nhà xuất bản Nông thôn.
- [5] Phạm Hoàng Hộ (1999-2000), *Cây cỏ Việt Nam, tập 1, tập 2, tập 3*, Nhà xuất bản Trẻ TP Hồ Chí Minh.
- [6] <http://www.theplantlist.org>.
- [7] Bộ Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (2007), *Sách đỏ Việt Nam (Phần II - Thực vật)*, Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và Công nghệ.
- [8] Chính phủ (2019), *Nghị định 06/2019/NĐ-CP ngày 22/1/2019 về quản lý thực vật rừng, động vật rừng nguy cấp, quý, hiếm và thực thi Công ước về buôn bán quốc tế các loài động vật, thực vật hoang dã nguy cấp*.

Nghiên cứu tối ưu hóa công nghệ sấy cá lóc *Channa maculata* bằng phương pháp sấy phối hợp bơm nhiệt và bức xạ hồng ngoại

Lê Thị Hồng Anh¹, Dương Hồng Quân¹, Bùi Huy Chính², Hoàng Ngọc Cương³, Lâm Thế Hải¹, Trần Quốc Đảm¹, Đặng Xuân Cường¹, Nguyễn Thị Thảo Minh¹, Lê Hoàng Phụng⁴, Đặng Văn Hải¹, Hoàng Thái Hà^{1*}

¹Trường Đại học Công nghiệp thực phẩm TP Hồ Chí Minh

²Sở KH&CN Bà Rịa - Vũng Tàu

³Trường Đại học Bình Dương

⁴Trường Đại học Kiên Giang

Ngày nhận bài 19/2/2021; ngày chuyển phản biện 25/2/2021; ngày nhận phản biện 5/4/2021; ngày chấp nhận đăng 9/4/2021

Tóm tắt:

Bài báo trình bày về điều kiện sấy bức xạ hồng ngoại kết hợp bơm nhiệt trên đối tượng cá lóc dựa theo mô hình thực nghiệm đa nhân tố bậc 1 của Box-Wilson. Kết quả cho thấy, mô hình toán học $Y = 8,92 + 0,44X_1 - 0,53X_2 - 0,48X_3 - 0,098X_1X_2 - 0,39X_1X_3 + 0,126X_2X_3$ thể hiện mối tương quan giữa thời gian sấy (Y) và các nhân tố tác động: nồng độ sorbitol (X_1), nhiệt độ sấy (X_2) và tốc độ gió (X_3), trong đó nhiệt độ sấy ảnh hưởng đến thời gian sấy mạnh hơn so với các yếu tố khác. Điều kiện sấy tối ưu là sorbitol 2,5%, nhiệt độ sấy 57,5°C, tốc độ gió 1,6 m/s, và thời gian sấy là 8,27h. Cá lóc khô ở điều kiện tối ưu đã đạt chất lượng cảm quan, vệ sinh an toàn thực phẩm và độ an toàn cao hơn so với các phương pháp sấy không khí và phơi dưới ánh sáng nắng mặt trời. Kết quả là cơ sở khoa học cho việc hoàn thiện và triển khai rộng rãi phương pháp sấy này trong sản xuất.

Từ khóa: Box-Wilson, bơm nhiệt, bức xạ hồng ngoại, cá lóc, sấy.

Chỉ số phân loại: 4.5

Đặt vấn đề

Cá lóc có kích cỡ trung bình, con lớn nhất có thể đạt 5-7 kg và sống được 4-5 năm, thậm chí có những con sống được đến 10 năm. Cá lóc thuộc loài cá dữ, thân dài hình trụ, miệng rộng, hàm răng nhọn và sắc. Cá lóc sinh trưởng rất nhanh, một con cá lóc trưởng thành có thể có chiều dài 15-16 cm/1 năm tuổi và 38-45 cm/2 năm tuổi.

Hiện nay, sản phẩm cá lóc được bảo quản tươi ở dạng đông lạnh, ướp muối hoặc chế biến ở dạng khô, trong đó lượng cá lóc chế biến ở dạng khô tăng nhanh do kéo dài được thời gian bảo quản, dễ chế biến thành nhiều món ăn như: chiên thường, chiên giòn, chiên sốt, nướng... hoặc chế biến thành các món ăn đặc sản như: cá lóc khô một nắng nướng chấm muối ớt, cá lóc khô một nắng chiên tỏi ớt và cá lóc khô một nắng chiên giòn...

Để làm khô cá lóc, hiện nay người ta vẫn dùng phương pháp phơi nắng, dùng lò sấy thủ công với tác nhân sấy là khói lò hoặc thiết bị sấy với tác nhân sấy là không khí được đốt nóng qua calorife kiểu khí - khói... Các phương pháp này có ưu điểm là đơn giản, chi phí đầu tư thấp nhưng có nhược điểm là luôn phụ thuộc vào điều kiện thời tiết, sản phẩm khô không đồng đều, tốn nhiều diện tích sân phơi, công lao động phụ và khó áp dụng cơ khí hóa, tự động hóa.

Một trong những kỹ thuật sấy mới có nhiều ưu điểm hiện nay là sấy phối hợp bơm nhiệt và bức xạ hồng ngoại. Công nghệ này giúp giảm thời gian sấy, cho phép sấy ở nhiệt độ thấp để hạn chế đến mức thấp nhất sự giảm sút chất lượng sản phẩm do nhiệt, phù hợp với vật liệu sấy có liên kết keo - mao dẫn như thịt, cá nói chung và cá lóc nói riêng [1-4]. Hơn nữa, công nghệ sấy này còn giúp hạn chế sự biến tính có thể làm giảm đặc tính quan trọng của nguyên liệu sấy đó là khả năng tái hydrat hóa sau sấy [5]. Vì vậy, việc nghiên cứu xác định chế độ sấy tối ưu cho sản phẩm cá lóc bằng phương pháp sấy phối hợp bơm nhiệt và bức xạ hồng ngoại để hoàn thiện công nghệ sấy nhằm triển khai ứng dụng rộng rãi trong sản xuất là vấn đề cấp thiết.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Vật liệu: cá lóc tươi *Channa maculata* có khối lượng 150-250 g/con, được thu mua từ huyện Cần Giuộc, TP Hồ Chí Minh có độ ẩm ban đầu 76,40%, được đánh giá chất lượng dựa theo TCVN 11045:2015. Cá sau khi thu mua được ướp đá, bảo quản trong thùng xốp cách nhiệt và vận chuyển về phòng thí nghiệm của Trường Đại học Công nghiệp thực phẩm TP Hồ Chí Minh, tiến hành rửa sạch bằng nước muối có nồng độ 1% khoảng

* Tác giả liên hệ: Email: Hoangha.huifi@gmail.com

Study on the drying condition optimisation of the heating pump and the infrared radiation for the snakehead fish *Channa maculata*

Thi Hong Anh Le¹, Hong Quan Duong¹,
Huy Chich Bui², Ngoc Cuong Hoang³, The Hai Lam¹,
Quoc Dam Tran¹, Xuan Cuong Dang¹,
Thi Thao Minh Nguyen¹, Hoang Phuong Le⁴,
Van Hai Dang¹, Thai Ha Hoang^{1*}

¹Ho Chi Minh city University of Food Industry

²Ba Ria - Vung Tau Department of Science and Technology

³Binh Duong University

⁴Kien Giang University

Received 19 February 2021; accepted 9 April 2021

Abstract:

The paper focused on the drying condition of the infrared radiation combining the heat pump for the snakehead fish basing on the level 1 multi-factor experimental planning model of Box-Wilson. The results showed the mathematical model ($Y = 8.92 + 0.44X_1 - 0.53X_2 - 0.48X_3 - 0.098X_1X_2 - 0.39X_1X_3 + 0.126X_2X_3$) that expressed the relationship between the drying time (Y) and the impact factors (the sorbitol concentration (X_1), the drying temperature (X_2), and the wind speed (X_3), in which the drying temperature (X_2) affected the drying time stronger than other factors. The optimisation condition of drying was the sorbitol concentration of 2.5%, the drying temperature at 57.5°C, the wind speed of 1.6 m/s, and the drying time of 8.27 hours. Dried snakehead fish at the optimum condition got the sensory quality, food hygiene, and safety higher than the air drying and sun drying methods. The results are a scientific basis for completing the technology and widely deploying the drying method in production.

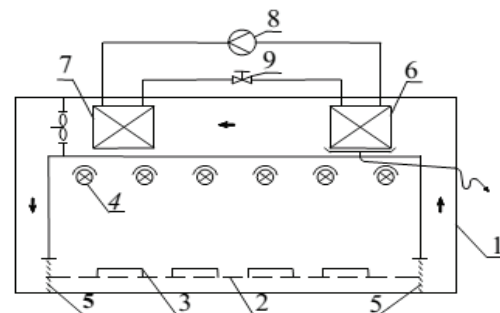
Keywords: Box-Wilson, drying, heat pump, infrared radiation, snakehead fish.

Classification number: 4.5

5 phút để loại bỏ tạp chất. Sau đó, cá được ngâm trong dung dịch sorbitol có nồng độ 2-12% trong thời gian 30 phút, tiếp theo chần qua nước sôi 90°C trong thời gian 15 giây, vớt ra, để ráo [6, 7]. Sau đó cá lóc được đem đi sấy trong thiết bị sấy thí nghiệm kiểu bơm nhiệt phối hợp bức xạ hồng ngoại đến độ ẩm 24±0,3%.

Thiết bị thí nghiệm: sử dụng thiết bị sấy bơm nhiệt và bức xạ hồng ngoại do Trường Đại học Công nghiệp thực phẩm TP

Hồ Chí Minh chế tạo. Thiết bị có năng suất 5 kg/m², công suất tiêu thụ điện 4,54 kW/h, tự động điều chỉnh nhiệt độ với sai số ±0,1°C và vận tốc gió với sai số ±0,1 m/s. Sơ đồ nguyên lý cấu tạo thiết bị sấy như hình 1. Nguyên lý làm việc của thiết bị như sau: không khí ẩm được quạt hút ra từ buồng sấy được làm lạnh và tách ẩm qua giàn lạnh, sau đó được gia nhiệt khi đi qua giàn nóng đến nhiệt độ nhất định, rồi thổi qua bề mặt nguyên liệu được gia nhiệt bằng các đèn bức xạ hồng ngoại để nhận ẩm thoát ra từ vật liệu sấy. Không khí này được đưa trở về giàn lạnh thành vòng tuần hoàn.



Hình 1. Thiết bị sấy bơm nhiệt kết hợp bức xạ hồng ngoại. 1: vỏ tủ sấy; 2: giá đỡ nguyên liệu dạng lưới; 3: nguyên liệu sấy; 4: đèn bức xạ hồng ngoại; 5: bộ phận phân phối gió; 6: dàn lạnh; 7: dàn nóng (dàn nóng); 8: máy nén lạnh; 9: van tiết lưu.

Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu thực nghiệm: áp dụng phương pháp quy hoạch thực nghiệm để nghiên cứu ảnh hưởng đồng thời của 3 yếu tố: nồng độ sorbitol Z_1 (%), nhiệt độ sấy Z_2 (°C), vận tốc gió Z_3 (m/s) đến thời gian sấy Y (h).

Ma trận thí nghiệm được xây dựng theo phương án quy hoạch thực nghiệm bậc 1 của Box-Wilson. Số lượng thí nghiệm theo phương án này được tính theo công thức sau [5]:

$$N = 2^m \quad (1)$$

Trong đó: 2^m : số thí nghiệm ở mức trên và dưới; m: số yếu tố ảnh hưởng. Với số yếu tố đầu vào m=3 thì tổng số thí nghiệm N=8.

Từ hệ tọa độ Z_1, Z_2, Z_3 chuyển sang hệ tọa độ mới không thứ nguyên X_1, X_2, X_3 theo công thức sau:

$$X_i = \frac{Z_i - Z_{i0}}{\Delta Z_i} \quad (2)$$

$$\Delta Z_i = \frac{Z_{it} - Z_{id}}{2} \quad (3)$$

Trong đó: X_i : giá trị mã hóa của yếu tố thứ i (i = 1÷3); Z_{it}, Z_{i0}, Z_{id} : giá trị thực của yếu tố thứ i ở mức trên, mức cơ sở và mức dưới; ΔZ_i : khoảng biến thiên của yếu tố thứ i; Z_{it}, Z_{i0}, Z_{id} có giá trị mã hóa -1, 0, +1.

Mức biến thiên, khoảng biến thiên và giá trị mã hóa của các yếu tố được lựa chọn theo bảng 1.

Bảng 1. Mức biến thiên, khoảng biến thiên và giá trị mã hoá của các yếu tố Z_i .

Các mức	Các yếu tố ảnh hưởng		
	Z_1 (%) nồng độ sorbitol	Z_2 (°C) nhiệt độ	Z_3 (m/s) vận tốc gió
Mức trên (+1)	12	60	3
Mức cơ sở (0)	7	55	2
Mức dưới (-1)	2	50	1
Khoảng biến thiên ΔZ_i	5	5	1

Mô hình toán các hàm thời gian sấy Y được biểu diễn bằng phương trình hồi quy bậc 1 [5]:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^m b_i x_i + \sum_{i=1}^m \sum_{j=i+1}^m b_{ij} x_i x_j \quad (4)$$

Sau khi kiểm tra tính tương thích của mô hình, nếu mô hình bậc 1 không thích ứng ta có thể chuyển sang mô hình bậc 2 hoặc 3.

Xác định các thông số công nghệ của quá trình sấy:

Các yếu tố ảnh hưởng (các yếu tố vào):

- Nhiệt độ dòng khí sấy được xác định bằng thiết bị đo nhiệt độ điện tử hiện số mã hiệu SGK-MF-904 (Hồng Kông), khoảng đo $-40 \div 200^\circ\text{C}$, sai số $\pm 0,5^\circ\text{C}$.

- Vận tốc gió được xác định bằng thiết bị đo tốc độ gió Testo 405- V_1 (Đức).

- Dung dịch sorbitol: tinh khiết do hãng Merck (Đức) cung cấp.

- Độ ẩm vật liệu sấy được xác định bằng phương pháp sấy đến khối lượng không đổi ở 105°C . Độ ẩm của mẫu được tính theo công thức sau [4]:

$$X = \frac{(G_1 + G_2)}{(G_1 - G)} \times 100\% \quad (5)$$

Trong đó: X : độ ẩm của vật liệu sấy (%); G_1 : khối lượng cốc sấy và mẫu thử trước sấy (g); G_2 : khối lượng cốc thử và mẫu thử sau sấy (g); G : khối lượng cốc sấy (g).

- Mức độ biến đổi độ ẩm trong quá trình sấy được tính theo công thức sau [8]:

$$W_2 = 100 - \frac{G_1(100 - W_1)}{G_2} (\%) \quad (6)$$

Trong đó: G_1 , G_2 : khối lượng của nguyên liệu trước và sau khi sấy (g); W_1 , W_2 : độ ẩm của nguyên liệu trước và sau khi sấy (%).

Các chỉ tiêu kinh tế - kỹ thuật (các thông số ra):

- Thời gian sấy Y (h) là khoảng thời gian thực hiện một mẻ sấy được tính từ lúc bắt đầu sấy đến khi sản phẩm đạt độ khô theo yêu cầu công nghệ (24%) và được xác định bằng đồng hồ đo thời gian thông dụng.

- Tỷ lệ tái hydrat hóa H_w (%): cân 20 g (m_1) cá lóc đã được

sấy khô cho vào 250 ml nước cất. Sau 15 phút vớt cá ra, để ráo nước trong 5 phút và cân khối lượng mẫu cá lóc đã ngâm nước (m_2). Tỷ lệ tái hydrat hóa của cá lóc được tính theo công thức sau [8]:

$$H_w = \frac{m_2 - m_1}{m_1} (\%) \quad (7)$$

- Chất lượng cảm quan của cá khô Q (điểm) được đánh giá theo phương pháp cho điểm với thang điểm 20 mô phỏng theo TCVN 3215-1979.

- Phương pháp xác định vi sinh vật: xác định tổng số vi sinh vật hiếu khí (Cfu/g) theo TCVN 5367:1991; xác định *E. coli* (Cfu/g) theo TCVN 7924-2008; xác định *Coliforms* (Cfu/g) theo TCVN 4882:2007; xác định *Salmonella* (Cfu/g) theo TCVN 4829:2005; xác định *V. cholerae* (Cfu/g) theo TCVN 7905-1:2008; xác định *S. aureus* (Cfu/g) theo TCVN 4830-1:2005.

Phương pháp xử lý số liệu: mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Phân tích thống kê ANOVA, hồi quy và tối ưu hóa bằng phần mềm Statgraphics centurion XVI, Excel.

Kết quả và thảo luận

Kết quả nghiên cứu thực nghiệm sấy cá lóc

Dựa trên kết quả khảo sát miền nghiên cứu tối ưu, nồng độ sorbitol từ 2 đến 14%, vận tốc gió thay đổi trong khoảng 1-3 m/s, và nhiệt độ sấy trong khoảng $50 \div 60^\circ\text{C}$ thấy rằng, càng tăng nồng độ sorbitol, thời gian sấy càng dài, chất lượng cảm quan, tỷ lệ hoàn nguyên của cá sấy càng cao. Nồng độ sorbitol hơn 14%, chất lượng cảm quan, tỷ lệ hoàn nguyên của cá sấy thấp hơn so với nồng độ sorbitol 2-12%. Tốc độ gió lớn hơn 3 m/s, cá sấy có tỷ lệ hoàn nguyên và chất lượng cảm quan thấp hơn khi sấy với tốc độ gió 1-3 m/s. Nhiệt độ sấy 55°C cho cá khô có chất lượng cảm quan và tỷ lệ hoàn nguyên đạt mức cao hơn so với các nhiệt độ khác. Vì vậy, trong nghiên cứu này miền tối ưu đã được tiến hành như phân bố thí nghiệm. Ma trận và kết quả thí nghiệm được ghi trong bảng 2. Giá trị thí nghiệm hàm thời gian sấy Y là trung bình cộng của 3 lần thí nghiệm lặp lại.

Bảng 2. Ma trận và kết quả thí nghiệm theo mô hình bậc 1 Box-Wilson.

Số thí nghiệm	Z_1	Z_2	Z_3	X_1	X_2	X_3	X_1X_2	X_1X_3	X_2X_3	$X_1X_2X_3$	Y
1	2	50	1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	9,13
2	12	50	1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	11,00
3	2	60	1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	8,00
4	12	60	1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	9,50
5	2	50	3	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	8,70
6	12	50	3	+1	-1	+1	-1	+1	-1	-1	9,00
7	2	60	3	-1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	8,10
8	12	60	3	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	7,98

Từ kết quả ở bảng 2, sử dụng phần mềm Statgraphics centurion XVI, Excel để xác định các hệ số hồi quy theo phương trình (4). Phân tích thống kê cho thấy sai tiêu chuẩn của tất cả các mẫu đều nhỏ hơn 0,05%. Kết quả này chứng tỏ có

sự phù hợp giữa lý thuyết và thực nghiệm, đồng thời đảm bảo độ tin cậy trong nghiên cứu thực nghiệm. Phân tích ANOVA cho thấy, mối tương quan chặt chẽ giữa các yếu tố tác động đã nghiên cứu lên hàm mục tiêu Y ($R^2 > 0,9$) (bảng 3). Sau khi tính toán và kiểm tra, đảm bảo sự tương thích của mô hình toán với thực nghiệm, ta được mô hình toán là phương trình hồi quy dạng tuyến tính:

$$Y = 8,92 + 0,44X_1 - 0,53X_2 - 0,48X_3 - 0,098X_1X_2 - 0,39X_1X_3 + 0,126X_2X_3 \quad (8)$$

Bảng 3. Kết quả phân tích ANOVA mô hình đáp ứng.

Thông số	Tổng bình phương	Bậc tự do	Trung bình bình phương	Tỷ lệ F	Hệ số p
A: nồng độ sorbitol	1,57531	1	1,57531	5041,00	0,0090
B: nhiệt độ sấy	2,25781	1	2,25781	7225,00	0,0075
C: vận tốc gió	1,85281	1	1,85281	5929,00	0,0083
AB	0,0780125	1	0,0780125	249,64	0,0402
AC	1,27201	1	1,27201	4070,44	0,0100
BC	0,127513	1	0,127513	408,04	0,0315
Sai số tổng	0,0003125	1	0,0003125		
Tương quan tổng	7,16379	7			
R^2 hiệu chỉnh	95,97%				

Từ phương trình hồi quy (8) cho thấy, với các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình sấy đã được lựa chọn trong nghiên cứu này: nồng độ sorbitol ngâm nguyên liệu X_1 (%), nhiệt độ sấy X_2 ($^{\circ}\text{C}$) và vận tốc gió X_3 (m/s) đều có ảnh hưởng lớn đến thời gian sấy và chất lượng cá lóc khô. Trong đó, nồng độ sorbitol có tác động mạnh nhất đến thời gian sấy ($b_1=0,44$), tiếp đến vận tốc gió ($b_3=-0,48$) và sau cùng là nhiệt độ sấy ($b_2=-0,53$) ($p<0,05$). Như vậy, trong giới hạn miền nghiên cứu: khi nhiệt độ sấy càng cao, nồng độ sorbitol ngâm nguyên liệu sấy càng thấp thì thời gian sấy càng ngắn.

Phương trình hồi quy hàm thời gian sấy Y bằng cách đạo hàm riêng đối với mỗi yếu tố X_i và cho bằng 0 ta được hệ 3 phương trình tuyến tính. Giải hệ phương trình này, được giá trị tối ưu dạng mã của các yếu tố vào X_1, X_2, X_3 như sau:

$$\begin{aligned} X_1 &= -0,9 \\ X_2 &= 0,5 \\ X_3 &= -0,4 \end{aligned} \quad (9)$$

Thay các giá trị X_1, X_2, X_3 từ công thức (9) vào công thức (8) xác định được giá trị tối ưu của hàm thời gian sấy $Y=8,27\text{h}$.

Chuyển sang giá trị thực của các yếu tố X_i theo công thức:

$$Z_i = X_i \cdot \Delta Z_i + Z_i^0 \quad (10)$$

Thay giá trị X_1, X_2, X_3 từ công thức (9) vào công thức (10), có giá trị tối ưu dạng thực của các yếu tố vào như sau:

$$Z_1 = -0,9 \cdot 5 + 7 = 2,5\% \quad (11)$$

$$Z_2 = 0,5 \cdot 5 + 55 = 57,5^{\circ}\text{C} \quad (12)$$

$$Z_3 = -0,4 \cdot 1 + 2 = 1,6 \text{ m/s} \quad (13)$$

Như vậy, chế độ tối ưu sấy cá lóc bằng phương pháp sấy phối hợp bơm nhiệt và bức xạ hồng ngoại là: nồng độ sorbitol là 2,5%, nhiệt độ không khí trong buồng sấy là 57,5 $^{\circ}\text{C}$ và tốc độ gió đi ngang qua nguyên liệu là 1,6 m/s.

Trên cơ sở các thông số tối ưu tìm được, chúng tôi đã tiến hành 3 thí nghiệm lặp lại ở chế độ tối ưu của các yếu tố vào: nồng độ sorbitol $Z_1=2,5\%$, nhiệt độ dòng khí sấy $Z_2=57,5^{\circ}\text{C}$, tốc độ gió đi ngang qua nguyên liệu $Z_3=1,6 \text{ m/s}$. Ngoài việc kiểm định thời gian sấy, đã xác định điểm cảm quan chất lượng sản phẩm sấy Q (điểm) và tỷ lệ tái hydrat hóa H_w (%).

Bảng 4. Kết quả thí nghiệm sấy ở chế độ tối ưu của các yếu tố vào.

Mẫu sản phẩm sấy	Nồng độ sorbitol Z_1 (%)	Nhiệt độ dòng khí sấy Z_2 ($^{\circ}\text{C}$)	Tốc độ dòng khí sấy Z_3 (m/s)	Thời gian sấy τ (h)	Tỷ lệ tái hydrat hóa H_w (%)	Chất lượng cảm quan Q (điểm)
TN1	2,5	57,5	1,6	8,24	67,00	18,23
TN2	2,5	57,5	1,6	8,30	66,67	18,24
TN3	2,5	57,5	1,6	8,26	66,78	18,24
Giá trị trung bình				8,27	66,82	18,24

Kết quả nghiên cứu xác định các thông số tối ưu về thời gian sấy cá lóc khô đảm bảo độ tin cậy được thể hiện ở bảng 4. Ngoài ra, chất lượng cảm quan đạt loại tốt (18,24 điểm) và tỷ lệ tái hydrat hóa 66,82% đạt yêu cầu công nghệ. Kết quả phù hợp với công bố trên thế giới về khả năng tái hydrate hóa của mực và cá khi sử dụng sorbitol [6, 7]. Các công bố cho thấy sorbitol giúp giảm thiểu độ xơ cứng và gia tăng độ tái hydrate của cá và mực, đồng thời có vai trò bảo quản cá và mực dựa trên việc bất hoạt quá trình chuyển hóa thối và giảm thiểu sự bay hơi nước của cá và mực [6, 7].

Phân tích một số chỉ tiêu chất lượng sản phẩm cá lóc khô

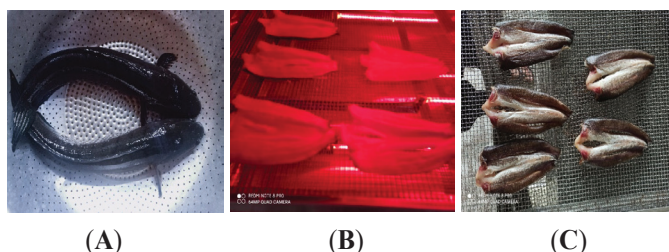
Cá lóc sau khi sấy phối hợp bơm nhiệt và bức xạ hồng ngoại được phân tích đánh giá chất lượng theo các chỉ tiêu: cảm quan, vật lý, hóa học và vi sinh. Chất lượng sản phẩm cá lóc được sấy bằng không khí nóng và phơi nắng với quy trình xử lý cá lóc trước khi sấy tương tự như khi sấy phối hợp bơm nhiệt và bức xạ hồng ngoại cũng được đánh giá song hành (bảng 5).

Bảng 5. Kết quả xác định một số chỉ tiêu chất lượng của sản phẩm cá lóc khô.

Chỉ tiêu	Đơn vị tính	Kết quả
Chế độ sấy		Sấy bơm nhiệt kết hợp bức xạ hồng ngoại
Nồng độ sorbitol	%	2,5
Nhiệt độ sấy	$^{\circ}\text{C}$	57,5
Vận tốc gió	m/s	1,6
Độ ẩm cá ban đầu	%	76,40
		Sấy bằng không khí nóng
		Phơi nắng
		2,5
		55÷70
		1,2
		76,40

Chỉ tiêu		Kết quả		
Chế độ sấy	Đơn vị tính	Sấy bom nhiệt kết hợp bức xạ hồng ngoại	Sấy bằng không khí nóng	Phơi nắng
Độ ẩm cá sau khi sấy	%	24±0,3	24±0,3	26±0,3
Chỉ tiêu cảm quan	Đơn vị tính	Sấy bom nhiệt kết hợp bức xạ hồng ngoại	Sấy bằng không khí nóng	Phơi nắng
Màu sắc		Màu cánh gián đặc trưng của cá khô, không lên dầu, bề mặt không có vết đen	Màu cánh gián đặc trưng của cá khô, không lên dầu, bề mặt không có vết đen	Thịt cá màu vàng sẫm, ít sáng bóng, bề mặt không có vết đen
Mùi		Mùi thơm đặc trưng của cá khô, không có mùi của hiện tượng phân hủy	Mùi thơm đặc trưng của cá khô, không có mùi của hiện tượng phân hủy, hơi có mùi hôi khét	Mùi thơm đặc trưng của cá khô, không có mùi của hiện tượng phân hủy, có mùi hôi khét
Vị		Vị ngọt đậm	Mặn dịu, ngọt thịt	Mặn dịu, ngọt thịt
Trạng thái		Khô đều, thịt dai, không lẫn tạp chất	Khô hơi đều, thịt dai, không lẫn tạp chất	Ít khô đều, thịt dai, không lẫn tạp chất
Chỉ tiêu vật lý	Đơn vị tính	Sấy bom nhiệt kết hợp bức xạ hồng ngoại	Sấy bằng không khí nóng	Phơi nắng
Tỷ lệ tái hydrat hóa	%	67,00±2,3	63,22±2,12	57,01±2,4
Lượng tạp chất	%	0	0	0
Hoạt độ nước		0,79±0,05	0,79±0,05	0,80±0,05
Thời gian	h	8,27	11,05	17
Chỉ tiêu hóa học	Đơn vị tính	Sấy bom nhiệt kết hợp bức xạ hồng ngoại	Sấy nóng	Phơi nắng
Nitơ tổng số	%	14±0,06	14±0,06	14±0,06
Protein thô	%	93±0,08	93±0,08	93±0,08
Tổng số vi sinh vật hiếu khí	Cfu/g	2,7x10 ²	2,9x10 ²	3,3x10 ²
<i>E. coli</i>	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính
Coliforms	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính
<i>Salmonella</i>	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính
<i>V. cholerae</i>	Cfu/g	<10	<10	<10
<i>S. aureus</i>	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính

Bảng 5 cho thấy, cá lóc sấy lạnh kết hợp bức xạ hồng ngoại có chất lượng tốt và đảm bảo tiêu chuẩn vệ sinh an toàn thực phẩm theo quy định hiện hành của Bộ Y tế.



Hình 2. Hình ảnh sấy cá lóc bằng bom nhiệt phối hợp bức xạ hồng ngoại. (A) Cá lóc tươi; (B) Cá lóc trong thiết bị sấy phối hợp bom nhiệt và bức xạ hồng ngoại; (C) Cá lóc khô.

Cá lóc sấy phối hợp đối lưu và bức xạ hồng ngoại đảm bảo được chất lượng cảm quan, các chỉ tiêu hóa lý và vi sinh tốt hơn so với cá lóc sấy bằng các phương pháp khác. Hơn nữa, công nghệ sấy phối hợp đối lưu và bức xạ hồng ngoại hoàn toàn có thể triển khai ở điều kiện Việt Nam. Sấy phối hợp đối lưu và bức xạ hồng ngoại sẽ là công nghệ sấy được ứng dụng nhiều trong lĩnh vực công nghệ sau thu hoạch, góp phần đảm bảo chất lượng các sản phẩm có nguồn gốc tự nhiên.

Kết luận

Thực nghiệm đa yếu tố theo phương án quy hoạch thực nghiệm bậc 1 Box-Wilson khi sấy cá lóc bằng phương pháp sấy phối hợp bom nhiệt và bức xạ hồng ngoại đã thiết lập được mô hình toán: $Y = 8,92 + 0,44X_1 - 0,53X_2 - 0,48X_3 - 0,098X_1X_2 - 0,39X_1X_3 + 0,126X_2X_3$, biểu diễn mối quan hệ giữa thời gian sấy Y với nồng độ sorbitol X_1 , nhiệt độ sấy X_2 và tốc độ gió X_3 , trong đó nồng độ sorbitol X_1 là yếu tố có ảnh hưởng lớn nhất đến thời gian sấy.

Giá trị tối ưu của các yếu tố vào: nồng độ sorbitol 2,5%, nhiệt độ sấy 57,5°C, tốc độ gió 1,6 m/s và giá trị tối ưu của thông số ra: thời gian sấy ngắn 8,27h. Cá lóc sấy ở điều kiện tối ưu này đạt chất lượng cảm quan, vệ sinh an toàn thực phẩm và có chất lượng vượt trội so với các phương pháp sấy bằng không khí nóng hoặc phơi nắng. Nghiên cứu là cơ sở quan trọng để hoàn thiện công nghệ và triển khai ứng dụng rộng rãi trong sản xuất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Đào Trọng Hiếu, Ngô Đăng Nghĩa (2005), “Nghiên cứu chế độ sấy tối ưu cho sản phẩm cá cơm khô bằng phương pháp sấy kết hợp hồng ngoại và bom nhiệt”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Thủy sản*, **2**, tr.8-11.
- [2] Đào Trọng Hiếu (2013), *Nghiên cứu sự biến đổi thành phần hóa học, tính chất vật lý và đề xuất biện pháp nâng cao chất lượng cá cơm sấy (Spratelloides gracilis) sấy hồng ngoại xuất khẩu*, Luận án tiến sĩ, Trường Đại học Nha Trang.
- [3] Ching Lik Hii, Sachin Vinayak Jangam, Sze Pheng Ong, A.S. Mujumdar (2012), *Solar Drying: Fundamentals, Applications and Innovations*, Published in Singapore.
- [4] Dov Prusky, Maria Lodovica Gullino (2009), *Post-harvest Pathology*, Springer Science & Business Media.
- [5] V.R. Sagar, P. Suresh Kumar (2010), “Recent advances in drying and dehydration of fruits and vegetables: a review”, *J. Food Sci. Technol.*, **47**, pp.15-26.
- [6] Zensuke Iseya, Tomokazu Kubo, Hiroki Saeki (2000), “Effect of sorbitol on moisture transportation and textural change of fish and squid meats during curing and drying processes”, *Fisheries Science*, **66**, pp.1144-1149.
- [7] Tomokazu Kubo, Hiroki Saeki (2001), “Role of sorbitol in manufacturing dried seafood from heated squid meat”, *Fisheries Science*, **67**, pp.524-529.
- [8] Nguyễn Thị Mỹ Trang, Vũ Ngọc Bội, Nguyễn Thị Hương, Hoàng Thái Hà, Đặng Xuân Cường (2016), “Nghiên cứu tối ưu hóa công đoạn sấy rong nho (*Caulerpa lentillifera*) bằng kỹ thuật sấy lạnh kết hợp bức xạ hồng ngoại”, *Tạp chí Khoa học Công nghệ Thủy sản*, **4**, tr.133-139.

Chuyển cấu trúc microRNA vào cây đậu nành (*Glycine max* (L.) Merr.) hạn chế sự ký sinh của tuyến trùng *Meloidogyne incognita*

Nguyễn Vũ Phong*, Hà Thị Trúc Mai, Đặng Lê Trâm, Nguyễn Thế Phương, Nguyễn Thị Ngọc Loan

Trường Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 7/9/2020; ngày chuyển phản biện 11/9/2020; ngày nhận phản biện 14/10/2020; ngày chấp nhận đăng 20/11/2020

Tóm tắt:

Effector là các protein được tuyến trùng tiết vào trong tế bào thực vật, tạo thuận lợi cho quá trình ký sinh cây chủ. Bất hoạt các gene mã hóa effector này có thể làm giảm khả năng ký sinh của tuyến trùng và giúp hạn chế tác hại do tuyến trùng gây ra. Trong nghiên cứu này, gene *Minc14137* mã hóa cho một effector chưa rõ chức năng được tạo dòng từ tuyến trùng *Meloidogyne incognita*. Từ trình tự gene giải mã, cấu trúc microRNA nhân tạo có khả năng bất hoạt gene *Minc14137* được tổng hợp và gắn vào vector biểu hiện. Tiếp theo vector này được chuyển vào lá mầm đậu nành bằng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* và tái sinh tạo cây chuyển gene. Số bản sao và mức độ biểu hiện của miRNA trong cây đậu nành chuyển gene được xác định bằng kỹ thuật qPCR. Ở cây đậu nành chuyển gene thế hệ T1, khả năng ký sinh của tuyến trùng *M. incognita* giảm 44,6-50,5% so với cây đối chứng. Kết quả cho thấy, effector MINC14137 giữ vai trò quan trọng trong tính ký sinh của tuyến trùng sung rễ.

Từ khóa: *Agrobacterium tumefaciens*, đậu nành, ký sinh, *Minc14137*, microRNA, tuyến trùng sung rễ.

Chỉ phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Đậu nành (*Glycine max* (L.) Merr.) là một trong những loại cây trồng quan trọng cung cấp protein và dầu thực vật trên thế giới. Do có giá trị dinh dưỡng cao nên đậu nành được xếp vào dạng cây trồng “thực phẩm chức năng” và đóng vai trò thiết yếu để nâng cao tiêu chuẩn thực phẩm cho người thiếu hụt protein ở những nước đang phát triển. Lượng dầu đậu nành đứng ở vị trí thứ nhất trong tổng số dầu thực vật được tiêu thụ trên thế giới [1]. Là nước nông nghiệp nhưng với cây đậu nành, Việt Nam liên tục phải nhập khẩu theo chiều hướng năm sau cao hơn năm trước. Tuyến trùng sung rễ, *Meloidogyne* sp. là một trong những loài tuyến trùng ký sinh thực vật gây thiệt hại về kinh tế lớn nhất trên cây trồng ở vùng ôn đới và nhiệt đới [2]. Loài tuyến trùng này có khả năng lây nhiễm cho hơn 5.500 loài thực vật, trong đó có đậu nành (gây thất thu 93.000 tấn/năm ở Mỹ) [3].

Việc sử dụng các chất hóa học độc tính cao để kiểm soát tuyến trùng tỏ ra có hiệu quả nhưng thiệt hại về hệ thực vật, động vật, môi trường và sức khỏe con người là rất lớn. Do vậy, việc sử dụng các chất hóa học đang ngày càng bị hạn chế và xu hướng là ngưng sử dụng hoàn toàn. Ngày nay, phương pháp luân canh kết hợp với việc sử dụng các giống kháng bệnh đã được áp dụng, nhưng phương pháp này gặp nhiều khó khăn do tuyến trùng sung rễ có phổ ký chủ rất rộng và giống đậu nành vừa có năng suất cao vừa kháng tuyến trùng vẫn còn đang nghiên cứu. Vì vậy, việc tìm kiếm một phương pháp mới, thân thiện với môi trường để kiểm soát tuyến trùng là hết sức cần thiết. Các hiểu biết về sự tương tác giữa tuyến trùng sung rễ và ký chủ ở mức độ phân tử là cần thiết để phát triển các chương trình kiểm soát tuyến trùng một cách bền vững. Hiện nay nhiều nghiên cứu đang tập trung vào việc xác định, mô

tả đặc điểm, chức năng và ức chế sự biểu hiện các effector của tuyến trùng. Sử dụng phương pháp làm câm lặng các gene mã hóa các protein độc tính này đang được quan tâm nghiên cứu và hứa hẹn là công cụ hữu hiệu tạo giống cây trồng kháng tuyến trùng sung rễ.

Trong nghiên cứu này, gene *Minc14137* mã hóa cho một effector chưa rõ chức năng được tạo dòng từ tuyến trùng *M. incognita* được sử dụng làm dữ liệu để tổng hợp microRNA nhân tạo có khả năng bất hoạt gene này. Cấu trúc microRNA sau đó được chèn vào vector biểu hiện và chuyển vào cây đậu nành ĐT22 bằng vi khuẩn *A. tumefaciens*.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Tuyến trùng *Meloidogyne incognita* phân lập từ rễ cây đậu nành trồng ở Đăk Nông, được lưu giữ tại Bộ môn Công nghệ sinh học, Trường Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh. Giống đậu nành ĐT22 được cung cấp từ Trung tâm Nghiên cứu và phát triển đậu đỗ, Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm. Vector pRS300 chứa ath-miR319a precursor được cung cấp bởi Detlef Weigel, Department of Molecular Biology, Max Planck Institute for Developmental Biology (Đức). Vector pSM103 chứa các gene *hptII* (kháng hygromycin), *aadA* (kháng kanamycin), cassette 35SP-erGFP7INT-NOS, đoạn miR319a của Arabidopsis chịu điều khiển bởi promoter GmUbiIII giúp biểu hiện đoạn microRNA ở cây đậu nành được cung cấp bởi Andrew F. Bent, University of Wisconsin-Madison (Mỹ) [4].

Tạo dòng gene *Minc14137* của tuyến trùng *M. incognita*

Từ thông tin bộ gene của tuyến trùng *M. incognita* [5], cặp primer đặc hiệu mã hóa protein gene *Minc14137* được thiết kế có

* Tác giả liên hệ: Email: nvphong@hcmuaf.edu.vn

Transformation of an artificial microRNA to soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) to reduce the parasitism of *Meloidogyne incognita*

Vu Phong Nguyen*, Thi Truc Mai Ha, Le Tram Dang,
The Phuong Nguyen, Thi Ngoc Loan Nguyen

Nong Lam University, Ho Chi Minh city

Received 7 September 2020; accepted 20 November 2020

Abstract:

Effectors are specific proteins secreted by nematodes into plant cells that facilitate their parasitism to host plants. Inactivation of these effectors could reduce the parasitic ability of nematodes on plants and the damage caused by nematodes. Gene *Minc14137* encodes an effector unknown function that is cloned from the *Meloidogyne incognita*. Artificial microRNAs capable of inactivating the gene *Minc14137* were synthesised and inserted into an expression vector in soybean. This construct was transformed into the soybean cotyledon node mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and regenerated transgenic plants. Copy number and the expression level of miRNA in T0 transgenic plants were determined by the qPCR technique. In T1 transgenic soybean plants, the pathogenic ability of root-knot nematode is reduced by 44.6-50.5% compared to the control plants. Results show that effector MINC14137 could play an important role in the parasitism of *Meloidogyne incognita*.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*, microRNA, *Minc14137*, parasitism, root-knot nematode, soybean.

Classification number: 4.6

trình tự Mi14137-F (5'-ATG AAA GCC CTC ATT AAA GC-3') và Mi14137-R (5'-TTA TTT TCC TCC AGC ACA TC-3'). RNA tổng số của J2s được tách chiết bởi GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific), tổng hợp cDNA bằng RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific). Đoạn trình tự mã hóa protein được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR với *Pfu* polymerase. Chu kỳ nhiệt gồm 35 chu kỳ 94°C/30 giây, 50°C/30 giây, 72°C/1 phút. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng GenJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific) và được thêm đuôi polyA trước khi chèn vào vector pGEM-T Easy (Promega). Sản phẩm nối được biến nạp vào tế bào *E. coli* TOP10 bằng phương pháp sốc nhiệt. Các khuẩn lạc chứa vector tái tổ hợp được sàng lọc bằng hệ thống xanh trắng và PCR khuẩn lạc. Plasmid tái tổ hợp được tách chiết bằng GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) và gene tạo

dòng được giải trình tự bởi Công ty First Base (Malaysia).

Tạo vector mang cấu trúc miRNA nhân tạo

Trình tự gene *Minc14137* phân lập có độ tương đồng đến 95% với cDNA của tuyến trùng *M. incognita* trên GenBank (ID: AW441106.1), được sử dụng để thiết kế các miRNA nhân tạo nhờ phần mềm WMD3 (<http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>). Trình tự amiRNA mục tiêu được chọn dựa theo các tiêu chí đề xuất bởi Schwab và cs (2006) [6]. Công cụ Oligo của phần mềm WMD3 được sử dụng để thiết kế các primer thay thế đoạn microRNA của precursor ath-mi319a bởi đoạn miRNA 21 nucleotide mới nhờ kỹ thuật PCR overlapping. Cấu trúc amiRNA sau đó được nhân dòng bởi vector pJET1.2/blunt (Thermo Scientific) và giải trình tự nhằm đảm bảo tính chính xác trước khi gắn vào vector biểu hiện. Đoạn miR319a trong vector pSM103 được thay thế bằng đoạn trình tự amiRNA tổng hợp. Vector pSM103 và đoạn amiRNA được cắt bằng enzyme *Bam*HI và *Pst*II (Thermo Scientific) và nối với nhau nhờ enzyme T4 DNA ligase (Thermo Scientific) để tạo vector tái tổ hợp. Vector tái tổ hợp pSM103-amiRNA được tạo dòng trong tế bào *E. coli* TOP10, sau đó biến nạp vào vi khuẩn *A. tumefaciens* LBA4404 để chuyển cấu trúc amiRNA vào cây chủ.

Tạo cây đậu nành chuyển gene

Hạt đậu nành được khử trùng theo quy trình của Trần Thị Cúc Hòa (2008) [7]. Chuẩn bị mẫu lá mầm đậu nành theo quy trình của Phan Lê Tư và cs (2018) [8]. Chủng *A. tumefaciens* LBA4404 mang vector pSM103-amiRNA được tăng sinh trong môi trường YEP chứa 50 mg/l kanamycin ở 28°C đến khi OD₆₀₀ đạt 1,0-1,2. Tiến hành thu sinh khối vi khuẩn và pha loãng trong môi trường IM lỏng thành dạng huyền phù. Mẫu nốt lá mầm được ngâm với dịch huyền phù vi khuẩn trong 30 phút, thấm khô và đặt úp lên môi trường CCM (đồng nuôi cấy mầm và vi khuẩn trong 4 hoặc 6 ngày) ở 25°C, trong điều kiện ánh sáng mờ. Để loại bỏ vi khuẩn trên mẫu đã lây nhiễm, rửa mẫu bằng môi trường tạo chồi bổ sung kháng sinh cefotaxime 100 mg/l, vancomycin 50 mg/l, timentin 50 mg/l. Mẫu sau rửa được cấy nghiêng một góc 45° trên môi trường thanh lọc có chứa cefotaxime 100 mg/l, timentin 50 mg/l. Sau 14 ngày, mẫu được chuyển sang môi trường tạo chồi bổ sung hygromycin 5 mg/l. Sau 28 ngày, tiếp tục chuyển mẫu sang môi trường bổ sung hygromycin 10 mg/l. DNA chồi giả định chuyển gene được tách chiết bằng GenJET Plant DNA Purification Kit, đo OD xác định nồng độ và độ tinh sạch, thực hiện phản ứng PCR sử dụng cặp primer HptII-F (5'-CAG CGA GAG CCT GAC CTA TTG C-3') và HptII-R (5'-GCC ATC GGT CCA GAC GGC CCG CGC-3') khuếch đại gene *hptII* kháng hygromycin có trên cấu trúc plasmid. *golgin84* là gene thường trực ở đậu nành được sử dụng làm đối chứng [9].

Kiểm tra số bản sao và mức độ biểu hiện của gene chuyển

Kiểm tra sự hiện diện của gene *hptII* ở cây giả định chuyển gene bằng kỹ thuật PCR. Số bản sao của microRNA chuyển vào cây đậu nành được xác định bằng kỹ thuật real-time PCR theo hướng dẫn của SensiFAST SYBR No Rox Kit (Thermo Scientific) nhờ sự hiện diện của đoạn gene *hptII* (KT985053) với gene tham chiếu là *actin* [10]. Số bản sao của gene *hptII* được ước tính bằng

tỷ lệ gene mục tiêu (*hptII*)/gene tham chiếu *actin* theo công thức:

$$X0/R0 = 10^{[(Ct, X - IX)/SX]} - [(Ct, R - IR)/SR] \quad [11].$$

Trong đó: Ct, X và Ct, R là giá trị Ct của gene *hptII* và *actin*; IX và SX là intercept và độ dốc của đường chuẩn của gene mục tiêu; IR và SR là intercept và độ dốc đường chuẩn của gene tham chiếu.

Đường chuẩn của gene mục tiêu (*hptII*, mRNA trên plasmid) và *actin* của DNA bộ gene được thiết lập tương ứng theo phương pháp của Sambrook và Russell (2001) [12]. Kích thước plasmid sử dụng trong nghiên cứu này là 12.917 bp và bộ gene đậu nành là 1.150 Mb [13]. Các cây đậu nành chuyển gene được cảm ứng tạo rễ và tạo cây con hoàn chỉnh. Cây con được thuần dưỡng trong nhà lưới. Hạt của cây T0 được thu nhận và gieo để thu cây T1. Cây chuyển gene T1 được xác định bằng sự hiện diện của gene *hptII*. Mức độ biểu hiện của amiRNA được xác định bằng phản ứng semi-PCR và realtime-PCR sử dụng 3 ng cDNA với gene tham chiếu *actin*. Sử dụng đối chứng là cây đậu nành ĐT22 không chuyển gen.

Đánh giá tính kháng của cây đậu nành chuyển gene với tuyến trùng

Khi cây đậu nành T1 được 15 ngày tuổi tiến hành lây nhiễm với 1.000 J2. Sau 30 ngày lây nhiễm, ghi nhận các chỉ tiêu như khối lượng tươi bộ rễ, số nốt sùng, số trứng và J2 tuyến trùng. Từ đó đánh giá khả năng kháng tuyến trùng của các cây chuyển gene. Số liệu được tính toán bằng phần mềm Microsoft Excel 2016 và xử lý thống kê bằng XLSTAT 2016. Đọc kết quả dựa vào bảng ANOVA, bảng trung bình và so sánh khác biệt giữa các nghiệm thức bằng phương pháp LSD (nếu có). Các số liệu được chuyển đổi đảm bảo phân phối chuẩn trước khi phân tích thống kê.

Kết quả và thảo luận

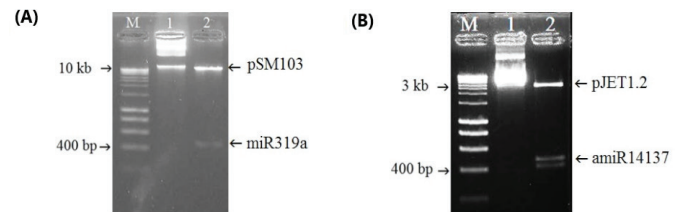
Tạo dòng gene *Minc14137*

Từ cDNA tổng số của dòng tuyến trùng phân lập đã khuếch đại được sản phẩm có kích thước khoảng 400 bp tương ứng với kích thước gene mục tiêu (435 bp). Trình tự đoạn gene khuếch đại được hiệu chỉnh và so sánh với trình tự gene *Minc14137* trong dữ liệu bộ gene của *Meloidogyne incognita* [5]; https://www6.inra.fr/meloidogyne_incognita và NCBI (ID: JK297517.1) cho kết quả tương đồng 97%. Trình tự đoạn gene *Minc14137* được đăng ký GenBank (MH315946.1) và sử dụng làm khuôn để thiết kế các miRNA nhân tạo.

Tổng hợp vector mang miRNA nhân tạo

Trong nghiên cứu này, microRNA nhân tạo được chọn ký hiệu là amiR14137, có trình tự (5'-UAA CUA UAA UCUA GGG CAC GU-3'). Cấu trúc precursor mang amiR14137 được tổng hợp và tạo dòng trong tế bào *E. coli* TOP10. Plasmid tái tổ hợp của 3 dòng vi khuẩn ngẫu nhiên được tách chiết và giải trình tự. Kết quả sau hiệu chỉnh cho thấy cấu trúc amiR14137 trình tự đúng với dự tính.

Vector pSM103 sau khi cắt tạo hai đoạn có kích thước lần lượt là 412 bp và 12 kb; plasmid pJET1.2/blunt-amiR14137 cho một đoạn 428 bp và 2.974 bp. Trên thực tế, kết quả điện di sản phẩm cắt vector pSM103 cho một băng có kích thước lớn hơn 10 kb và một

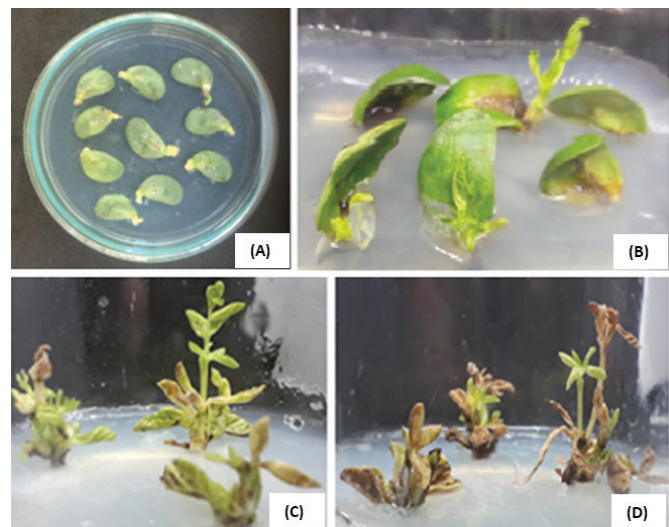


Hình 1. Kết quả cắt vector pSM103 (A) và pJET1.2-amiR14137 (B). M: DNA marker 1 kb (Bioline); 1: plasmid; 2: cắt bằng *Bam*HI và *Pst*II.

băng tương đương 400 bp, plasmid pJET1.2/blunt-amiR14137 cho một băng gần 3 kb và một băng lớn hơn 400 bp (hình 1). Vector pSM103 mở vòng và đoạn amiR14137 được thu hồi từ gel agarose bằng GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific). Sau đó sản phẩm được nối với nhau bằng enzyme T4 DNA ligase và biến nạp vào tế bào *E. coli* TOP10. Kết quả đã tạo dòng thành công amiRNA và cấu trúc này được thu nhận, biến nạp vào vi khuẩn *A. tumefaciens* LBA4404 và áp dụng tạo cây đậu nành chuyển gene.

Tạo cây đậu nành chuyển gene

Mẫu trên môi trường đồng nuôi cấy CCM cảm ứng phình to, mép lá cong lên khỏi mặt tiếp xúc với môi trường, chồi tái sinh trên môi trường TSTL cao 1-2 cm, chồi có màu xanh nhạt, 1-2 chồi (hình 2).



Hình 2. Hình thái mẫu đậu nành và chồi tái sinh trên các môi trường. (A) Đồng nuôi cấy; (B) Tái sinh chồi; (C) 5 mg/l hygromycin; (D) 10 mg/l hygromycin.

Khi lây nhiễm với *A. tumefaciens*, tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo chồi cao hơn khi không lây nhiễm (từ 5,8-14,1%). Tỷ lệ mẫu tái sinh chồi ở thời gian đồng nuôi cấy 6 ngày cao hơn so với 4 ngày nuôi cấy. Mẫu đồng nuôi cấy 4 ngày có tỷ lệ mẫu cảm ứng từ 58 đến 70%, tỷ lệ mẫu tạo chồi sau 14 ngày lần lượt là 20,8 và 21,6%. Đối với mẫu đồng nuôi cấy 6 ngày, tỷ lệ mẫu cảm ứng đạt từ 80,7 đến 84%, tỷ lệ mẫu tạo chồi sau 14 ngày đạt từ 30 đến 39,1% (bảng 1). Vì vậy trong nghiên cứu này, thời gian đồng nuôi cấy 6 ngày phù hợp cho giống đậu nành ĐT22.

Bảng 1. Kết quả chọn lọc chồi đậu nành giả định chuyển gen.

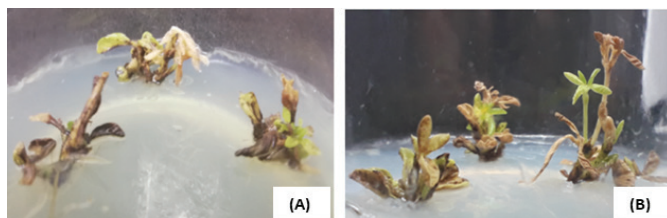
Thời gian đồng nuôi cây	Đợt	Mẫu	Số mẫu cảm ứng (%)	Số mẫu tạo chồi sau 14 ngày (%)	Số chồi/mẫu sau 14 ngày
4 ngày	1	ĐC	54,7	15,0	1,25±0,35
		LN	70,0	20,8	1,27±0,33
	2	ĐC	50,0	15,0	1,25±0,35
		LN	58,0	21,6	1,24±0,26
6 ngày	1	ĐC	74,7	25,0	1,17±0,23
		LN	80,7	39,1	1,39±0,25
	2	ĐC	64,7	20,0	1,34±0,47
		LN	84,0	30,0	1,26±0,25

ĐC: đối chứng; LN: lây nhiễm.

Bảng 2. Tỷ lệ mẫu sống trên môi trường chứa hygromycin.

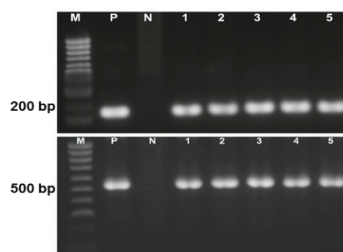
Đợt	Tỷ lệ mẫu sống (%)	
	+ 5 mg/l hygromycin 28 ngày	+ 10 mg/l hygromycin 28 ngày
1	96,0 (24/25)	8,0 (2/25)
2	89,3 (25/28)	9,3 (3/28)

Trong nghiên cứu, các chồi giả định chuyển gene khi chuyển lên môi trường chứa 5 mg/l hygromycin vẫn phát triển với tỷ lệ mẫu sống từ 89-96% (bảng 2), tuy nhiên một phần lá mầm bị vàng, xuất hiện các đốm đen trên lá mầm và chồi phát sinh, trụ mầm bị hoá nâu. Sau 28 ngày, trên môi trường chọn lọc chứa 10 mg/l hygromycin hầu hết chồi nhanh bị ức chế sinh trưởng, vàng lá và chết (hình 3). Sau 14 ngày, còn 8% mẫu chồi còn sống. Mẫu chồi đậu nành còn sống được kiểm tra bằng PCR và chuyển sang môi trường vươm chồi.



Hình 3. Chồi đậu nành ở môi trường bổ sung 10 mg/l hygromycin sau 14 ngày. (A) Đợt 1; (B) Đợt 2.

DNA tổng số từ lá 5 cây đậu nành giả định chuyển gene được tách chiết để xác định thể chuyển gene thông qua sự hiện diện của gene *hptII*. Kết quả cho thấy, 5 chồi giả định chuyển gene xuất hiện băng có kích thước khoảng 500 bp, tương ứng với kích thước gene *hptII* là 508 bp (hình 4). Do đó, có thể khẳng định bước đầu thu nhận được chồi chuyển gene T0.



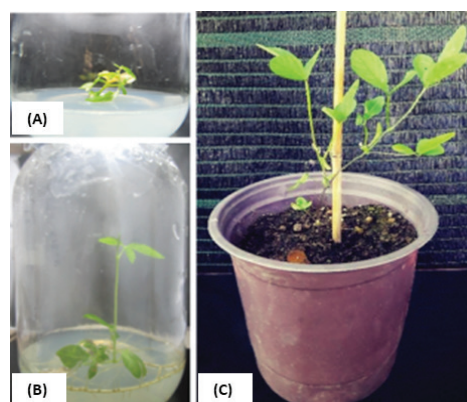
Hình 4. Kết quả PCR gene *golgin 84* (trên) và *hptII* (dưới) các chồi giả định chuyển gene. M: thang DNA chuẩn 100 bp (bioline); 1, 2, 3, 4, 5: chồi đậu nành giả định chuyển gen. Hình trên: P: đậu nành không lây nhiễm; N: đối chứng âm; hình dưới: P: plasmid pSM103; N: đậu nành không lây nhiễm.

Số copy chèn vào bộ gene cây đậu nành T0 được xác định bằng kỹ thuật real-time PCR. Tỷ số gene *hptII*/gene tham chiếu của cây chuyển gene so với đối chứng dao động trong khoảng 0,79-1,58 cho thấy số bản *hptII* là 1 hoặc 2 bản (bảng 3).

Bảng 3. Số copy gene *hptII* trong cây đậu nành T0.

Mẫu đậu nành	Ct <i>actin</i>	Ct <i>hptII</i>	Tỷ số <i>hptII/actin</i>	Số copy <i>hptII</i>
ĐT22-1	23,79	24,17	1,52	2
ĐT22-2	23,56	24,08	1,38	1
ĐT22-3	23,22	24,54	0,79	1
ĐT22-4	23,69	24,01	1,58	2
ĐT22-5	23,41	24,56	0,89	1

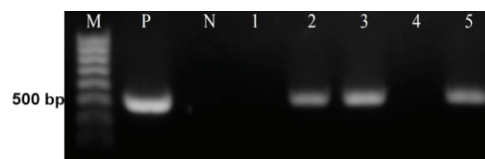
Các chồi được tiếp tục nuôi tạo rễ hoàn chỉnh và thuần hóa nhằm thu nhận được cây T1 cho các phân tích tiếp theo. Kết quả tạo cây đậu nành chuyển gene được thể hiện ở hình 5.



Hình 5. Tạo cây đậu nành chuyển gen. (A) Chồi đậu nành trên môi trường cảm ứng vươm chồi; (B) Chồi đậu nành tạo rễ; (C) Cây đậu nành T0 trồng trong nhà lưới.

Xác định cây chuyển gene thể hệ T1

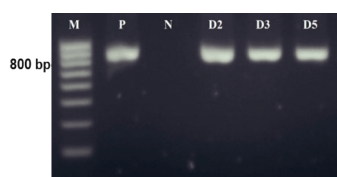
Các cây đậu nành chuyển gene T0 mang gene chuyển ở dạng dị hợp tử. Để kiểm tra tính kháng của cây T1 đối với tuyến trùng cần xác định sự hiện diện và mức độ biểu hiện của gene chuyển. Hạt của các cây chuyển gene T0 được gieo trong nhà lưới và cây chuyển gene T1 được xác định thông qua sự hiện diện của gene chuyển *hptII*. Kết quả phân tích PCR cho thấy, có 3 cây chuyển gene T1 là ĐT22-2-2, ĐT22-3-1 và ĐT22-5-1 (hình 6).



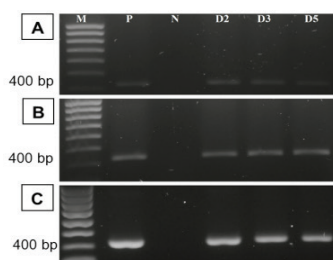
Hình 6. Kết quả điện di PCR gene *hptII* ở các cây thể hệ T1. M: thang DNA chuẩn 100 bp (bioline); P: đối chứng dương; N: đối chứng âm; 1, 2, 3, 4, 5: ĐT22-2-1, ĐT22-2-2, ĐT22-3-1; ĐT22-3-2, ĐT22-5-1.

Xác định sự biểu hiện của amiRNA trong cây đậu nành T1

cDNA tổng số của 3 cây ĐT22-2-2, ĐT22-3-1, ĐT22-5-1 được tổng hợp để xác định mức độ biểu hiện của miRNA ở cây đậu nành. Primer của gene *actin* đậu nành (*GmAct*) được sử dụng như đối chứng kiểm tra chất lượng của cDNA (hình 7).



Hình 7. Kết quả điện di sản phẩm RT-PCR gene *actin* đậu nành. M: thang DNA chuẩn 100 bp; P: đối chứng dương; N: đối chứng âm; D2, D3, D5: DT22-2-2, DT22-3-1, DT22-5-1.



Hình 8. Kết quả semi RT-PCR đoạn amiR-16281 ở các cây T1. (A) 25 chu kỳ; (B) 30 chu kỳ; (C) 35 chu kỳ; M: thang DNA chuẩn 100 bp; P: đối chứng dương; N: đối chứng âm; D2, D3, D5: DT22-2-2, DT22-3-1, DT22-5-1.

Mức độ biểu hiện tương đối của amiR-16281.1 được phân tích bởi phản ứng semi RT-PCR với 25, 30, 35 chu kỳ. Kết quả cho thấy, sự biểu hiện của amiRNA ở 3 cây chuyển gene T1 tương đương nhau thông qua cường độ phát sáng của sản phẩm PCR khi chụp dưới tia UV (hình 8). Mức độ biểu hiện của microRNA còn được xác định bằng kỹ thuật qPCR. Kết quả cho thấy, 3 cây đậu nành chuyển gene đều có sự biểu hiện của microRNA với mức độ cao gấp 3-6 lần cây không chuyển gen, thấp nhất ở cây DT22-3-1 (bảng 4).

Bảng 4. Mức độ biểu hiện của miRNA ở 3 cây đậu nành chuyển gen.

Cây đậu nành	Ct <i>actin</i>	Ct miRNA	Tăng so với cây không chuyển gen
DT22-2-2	23,09	26,89	6,84
DT22-3-1	23,49	32,54	3,21
DT22-5-1	23,28	28,08	5,97

Mức độ kháng tuyến trùng của cây đậu nành chuyển gen

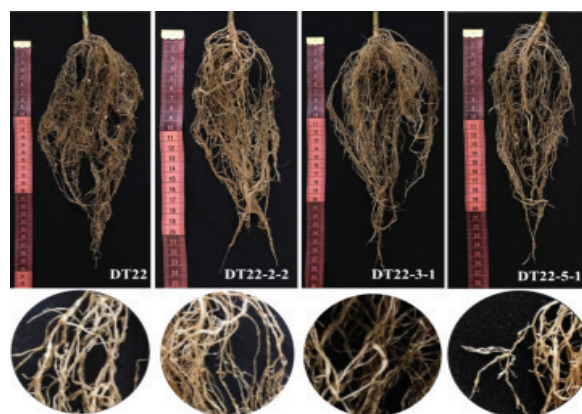
Sau 30 ngày lây nhiễm với 1.000 J2, số liệu về khối lượng rễ tươi và số nốt sừng hình thành, số con cái, số túi trứng, trứng và tuyến trùng J2 được ghi nhận. Ở cây chuyển gene, các chỉ tiêu ghi nhận giảm 44,6-50,5% so với đối chứng (bảng 5).

Bảng 5. Mức độ kháng tuyến trùng Mi của các cây đậu nành chuyển gene.

Cây	Số nốt sừng/1 g rễ	Số con cái/1 g rễ	Số túi trứng/1 g rễ	Số J2/1 g rễ	Số J2/50 g đất	Rf	Giảm (%)
DT22	53,3	25,1	21,5	7,1	46,6	2,89	-
DT22-2-2	37,1	14,2	7,1	4,4	23,1	1,43	50,5
DT22-3-1	37,4	10,3	2,8	11,3	25,0	1,60	44,6
DT22-5-1	39,5	21,3	11,3	8,0	22,8	1,47	49,1

Cây đậu nành chuyển gene sinh trưởng bình thường so với cây đối chứng không chuyển gen, các nốt sừng tạo ra trên rễ ít hơn so với cây đối chứng (hình 9).

Kết quả đã xác định được cả 3 cây đậu nành chuyển gene có khả năng kháng đối với tuyến trùng *M. incognita*, chứng minh vai trò quan trọng của effector tham gia trong quá trình ký sinh của tuyến trùng và hiệu quả của phương pháp RNA can thiệp ứng dụng trong



Hình 9. Rễ đậu nành chuyển gene sau 30 ngày lây nhiễm tuyến trùng.

chọn tạo giống cây trồng kháng với tác nhân sinh học gây bệnh.

Kết luận và đề nghị

Dựa vào trình tự gene *Minc14137*, cấu trúc amiRNA có khả năng bất hoạt sự biểu hiện của gene này đã được tổng hợp và biến nạp thành công vào vi khuẩn *A. tumefaciens* LBA4404 để tạo cây đậu nành biến đổi gene. Thời gian đồng nuôi cây 6 ngày giúp tăng số mẫu tạo chồi sau lây nhiễm và hiệu quả chuyển nạp gene so với thời gian đồng nuôi cây 4 ngày. Cần tiếp tục cải tiến quy trình chuyển gene và tạo cây đậu nành, sau đó thực hiện khảo sát thực tế với tuyến trùng *M. incognita* nhằm làm sáng tỏ vai trò của effector MINC14137.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] OECD-FAO (2020), *OECD-FAO Agricultural Outlook 2020-2029*, FAO, Rome/OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/1112c23b-en>.
- [2] D.L. Trudgill, V.C. Blok (2001), "Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens", *Annual Review of Phytopathology*, **39**(1), pp.53-77.
- [3] V.C. Blok, et al. (2008), "Parasitism genes and host range disparities in biotrophic nematodes: the conundrum of polyphagy versus specialisation", *Bioessays*, **30**, pp.249-259.
- [4] S. Melito, et al. (2010), "A nematode demographics assay in transgenic roots reveals no significant impacts of the Rhg1 locus LRR-Kinase on soybean cyst nematode resistance", *BMC Plant Biol.*, **10**, p.104.
- [5] P. Abad, et al. (2008), "Plant parasitism in metazoans: insights from the *Meloidogyne incognita* nematode genome", *Nat. Biotech.*, **26**, pp.909-915.
- [6] R. Schwab, et al. (2006), "Highly specific gene silencing by artificial miRNAs in *Arabidopsis*", *Plant Cell*, **18**, pp.1121-1133.
- [7] Trần Thị Cúc Hoà (2008), "Tối ưu hóa quy trình chuyển nạp gene đậu tương bằng cải tiến phương pháp lây nhiễm với *Agrobacterium tumefaciens*", *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, **9**, tr.8-11.
- [8] Phan Lê Tư, Tôn Bảo Linh, Nguyễn Vũ Phong (2018), "Đánh giá khả năng tái sinh và chuyển gene nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* ở một số giống đậu nành", *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Nông lâm nghiệp*, **1**, tr.8-15.
- [9] J. Marcolino Gomes, et al. (2015), "Transcriptome-wide identification of reference genes for expression analysis of soybean responses to drought stress along the day", *PLOS ONE*, **10**(9), DOI: 10.1371/journal.pone.0139051.
- [10] M. Libault, et al. (2008), "Identification of four soybean reference genes for gene expression normalization", *The Plant Genome*, **1**, pp.44-54.
- [11] S. Li, et al. (2017), "Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation in soybean", *Frontiers in Plant Science*, **8**, p.246.
- [12] J.F. Sambrook, D.W. Russell (2001), *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- [13] J. Schmutz, et al. (2010), "Genome sequence of the palaeopolyploid soybean", *Nature*, **463**, pp.178-183.

QUY ĐỊNH VỀ BÀI VIẾT ĐĂNG TẢI TRÊN TẠP CHÍ

Yêu cầu chung

Bài viết gửi đăng trên Tạp chí phải là bài viết nguyên thủy (chưa được công bố trước đó). Tác giả không được gửi đăng bài viết trên các tạp chí khác cho đến khi có quyết định xét duyệt của Ban Biên tập.

Bài báo dài không quá 10 trang (bao gồm cả bảng biểu, ghi chú, tài liệu tham khảo và phụ lục); font chữ: Times New Roman; cỡ chữ 13; khổ giấy A4, lề trên 2 cm, lề dưới 2 cm, lề trái 3 cm, lề phải 2 cm.

Bài viết gửi về Tòa soạn dưới dạng file mềm và bản in; có thể gửi trực tiếp đến Tạp chí (Phòng 507, số 113 Trần Duy Hưng, Cầu Giấy, Hà Nội) hoặc qua hòm thư điện tử, địa chỉ: khcnvn@most.gov.vn.

Tên bài báo

- Tên bài báo được viết bằng tiếng Việt và tiếng Anh, trên trang đầu của bài báo, không gạch chân hay viết nghiêng.

- Tên bài báo phải ngắn gọn, rõ ràng và phù hợp với nội dung bài báo.

- Phía dưới tên bài báo là tên tác giả không viết chức danh và học hàm, học vị. Nếu có nhiều tác giả làm việc ở các cơ quan khác nhau thì tên tác giả được đánh số (^{1,2...}) ở phía trên. Dấu hoa thị (*) chỉ tác giả liên hệ, được viết ở cuối trang đầu tiên của bài báo.

Tóm tắt

Tóm tắt bằng tiếng Việt và tiếng Anh. Nêu được mục đích, phương pháp nghiên cứu chính, kết quả nghiên cứu và kết luận chủ yếu. Từ khoá bằng cả tiếng Việt và tiếng Anh theo thứ tự alphabet. Chỉ số phân loại (theo hướng dẫn).

Dẫn nhập/đặt vấn đề

Định nghĩa vấn đề, tóm lược vấn đề nghiên cứu đã được công bố trong và ngoài nước, nêu mục tiêu nghiên cứu và giải thích sự lựa chọn đề tài và mục tiêu nghiên cứu để thấy được tính thời sự, tính khoa học và sự cần thiết của vấn đề nghiên cứu.

Đối tượng và phương pháp

Đối tượng nghiên cứu cần trình bày tiêu chuẩn lựa chọn, đặc điểm đối tượng nghiên cứu.

Phương pháp nghiên cứu cần nêu rõ cách tiếp cận nghiên cứu, loại hình nghiên cứu, phương pháp đo lường, công thức tính cỡ mẫu, phương pháp xử lý số liệu, mô tả kỹ các kỹ thuật tiến hành trong nghiên cứu; các quan điểm, lập luận, ý kiến tranh luận, các dẫn chứng...

Kết quả

Trình bày đầy đủ, khách quan các kết quả thu được sau nghiên cứu, các kết quả này phải phục vụ cho mục tiêu nghiên cứu. Các số liệu phải chính xác và khớp với nhau.

Phần kết quả nghiên cứu chỉ trình bày các kết quả nghiên cứu của đề tài, không giải thích, so sánh và bàn luận.

Bàn luận

Chủ yếu bàn luận các vấn đề liên quan đến mục tiêu đề tài.

Nhận xét, đánh giá một cách khách quan các kết quả nghiên cứu, có so sánh với các tác giả khác để khẳng định hoặc phủ định những hiểu biết đã có, qua đó nêu được những điểm mới và đóng góp của đề tài.

Dự báo hướng nghiên cứu tiếp và khả năng ứng dụng các kết quả nghiên cứu vào thực tiễn.

Kết luận

Nêu kết quả nghiên cứu chủ yếu của đề tài có tính khái quát liên quan đến mục tiêu nghiên cứu, đề xuất các vấn đề tiếp tục nghiên cứu.

Chú thích và tài liệu tham khảo

Chú thích được đánh số theo thứ tự xuất hiện (^{1,2,3...}) và được trình bày ngay ở cuối trang viết (footnote). Các tài liệu tham khảo được đánh số theo thứ tự xuất hiện để chỉ dẫn chúng được trích dẫn ở đâu trong bài báo. Số thứ tự được đánh trong ngoặc vuông, ví dụ: [3] với 1 hoặc [2, 5, 7-9] với nhiều số chỉ dẫn.

Tác giả (Năm xuất bản), "Tên tài liệu được trích dẫn", *Tên nguồn*, **tập (số)**, pp<trang đầu-trang cuối>

Tác giả: là tác giả/các tác giả của tài liệu được tham khảo, trích dẫn.

Năm xuất bản: năm xuất bản của tài liệu được tham khảo, trích dẫn.

Tên tài liệu được trích dẫn: là tên bài báo, chương/phần sách...

Tên nguồn có thể là tên tạp chí, tên sách, hay tên tài liệu gốc của tài liệu được trích dẫn (phần này được in nghiêng).

Tập (số): dành cho nguồn trích là tạp chí, sách hoặc các xuất bản phẩm khác (phần này in đậm).

Trang đầu-trang cuối là số thứ tự các trang phản ánh nơi cư trú của tài liệu được trích dẫn trong tài liệu nguồn.

Chú ý: nếu có ≥ 2 tài liệu tham khảo do cùng 1 tác giả/nhóm tác giả, cùng năm công bố, thì các tài liệu tham khảo này cần được đánh dấu a, b... sau năm xuất bản (ví dụ: 1986a).

Nếu có một số tài liệu tham khảo trong cùng 1 bài báo được trích dẫn có số trang khác nhau thì cần trích dẫn thêm số trang, ví dụ: Kitchen (1982, p 39).

Các yêu cầu khác

- Bài viết không đạt yêu cầu, Tòa soạn không trả lại bản thảo.

- Bài viết chỉ được đăng khi phản biện nhận xét về chất lượng bài báo đồng ý cho đăng.

- Bản quyền: tác giả đồng ý trao bản quyền bài viết (bao gồm cả phần tóm tắt) cho Ban Biên tập Tạp chí.

PHÂN LOẠI LĨNH VỰC KHOA HỌC

1. Khoa học tự nhiên

- 1.1. Toán học và thống kê
- 1.2. Khoa học máy tính và thông tin
- 1.3. Vật lý
- 1.4. Hóa học
- 1.5. Khoa học trái đất và môi trường
- 1.6. Khoa học sự sống
- 1.7. Khoa học nano
- 1.8. Khoa học tính toán
- 1.9. Các lĩnh vực khác của khoa học tự nhiên

2. Khoa học kỹ thuật và công nghệ

- 2.1. Kỹ thuật dân dụng: kỹ thuật kiến trúc; kỹ thuật xây dựng; kỹ thuật kết cấu và đô thị; kỹ thuật giao thông vận tải; kỹ thuật thủy lợi; kỹ thuật địa chất công trình
- 2.2. Kỹ thuật điện, kỹ thuật điện tử, kỹ thuật thông tin
- 2.3. Kỹ thuật cơ khí, chế tạo máy
- 2.4. Kỹ thuật hóa học
- 2.5. Kỹ thuật vật liệu và luyện kim
- 2.6. Kỹ thuật y học
- 2.7. Kỹ thuật môi trường
- 2.8. Công nghệ sinh học công nghiệp
- 2.9. Công nghệ nano
- 2.10. Kỹ thuật thực phẩm và đồ uống
- 2.11. Các lĩnh vực khác của khoa học kỹ thuật và công nghệ

3. Khoa học y - dược

- 3.1. Y học cơ sở
- 3.2. Y học lâm sàng
- 3.3. Y học dự phòng
- 3.4. Dược học
- 3.5. Các lĩnh vực khác của Y - dược học

4. Khoa học nông nghiệp

- 4.1. Trồng trọt
- 4.2. Chăn nuôi
- 4.3. Thú y
- 4.4. Lâm nghiệp
- 4.5. Thủy sản
- 4.6. Công nghệ sinh học trong nông nghiệp, thủy sản
- 4.7. Các lĩnh vực khác của khoa học nông nghiệp

5. Khoa học xã hội và nhân văn

- 5.1. Tâm lý học
- 5.2. Kinh tế và kinh doanh
- 5.3. Khoa học giáo dục
- 5.4. Xã hội học
- 5.5. Pháp luật
- 5.6. Khoa học chính trị
- 5.7. Địa lý kinh tế và xã hội
- 5.8. Thông tin đại chúng và truyền thông
- 5.9. Lịch sử và khảo cổ học
- 5.10. Ngôn ngữ học và văn học
- 5.11. Triết học, đạo đức và tôn giáo
- 5.12. Nghiên cứu về khu vực và quốc tế
- 5.13. Các lĩnh vực khác của khoa học xã hội và nhân văn

TẠP CHÍ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

Vietnam Journal of Science and Technology - MOST

Volume 63 - Number 5 - May 2021

Mối liên quan giữa đa hình rs1801321 gen RAD51 và nguy cơ mắc ung thư buồng trứng.

Lê Nguyễn Trọng Nhân, Nguyễn Thu Thúy, Nguyễn Quý Linh, Trần Văn Khánh, Trần Huy Thịnh, Tạ Thành Văn, Nguyễn Việt Tiến

Đánh giá chỉ số độ sâu tiền phòng và chiều dài trục nhãn cầu trên mắt cận thị cao.

Nguyễn Thị Thu Hiền, Phạm Thị Minh Châu

Xây dựng quy trình phân tích kiểm tra chất lượng dược chất phóng xạ ^{18}F -Choline.

Vũ Thanh Quang, Hà Ngọc Khoán, Bùi Thanh Rin, Nguyễn Trung Dũng, Phạm Tuấn Linh, Nguyễn Thị Hải Yến, Đoàn Thị Thu Hiền

Nghiên cứu đặc điểm người bệnh chạy thận nhân tạo tại 26 bệnh viện của Hà Nội năm 2020.

Hoàng Giang, Trịnh Hồng Sơn, Lê Thị Kim Nhung, Ngô Thị Huyền, Vũ Thị Hồng Vân, Trần Đức Hùng, Nguyễn Dương Hùng, Hoàng Văn Thông, Trần Tuấn Anh, Nguyễn Văn Thành, Nguyễn Thành Đạt, Vũ Tá Nam, Nguyễn Hữu Sâm, Hà Trung Chính

Khảo sát khả năng kháng ung thư *in vitro* của doxorubicin bao trong hạt nano oxy hóa khử nhạy pH.

Nguyễn Thị Hoàng, Trịnh Như Thủy, Vòng Bính Long

Thẩm định quy trình xác định đồng thời Zidovudin và Lamivudin trên hệ chất mang nano dendrimer G3.0-F127@AZT/3TC bằng phương pháp HPLC-PDA.

Nguyễn Thị Thịnh, Nguyễn Cửu Khoa

Nghiên cứu tính ức chế thực vật của 6 loài cây họ cúc (Asteraceae) và định lượng hàm lượng phenolic và flavonoid tổng.

Ngô Chí Nam, Phan Khánh Linh, Hồ Lệ Thi

Nghiên cứu hoạt tính kháng nấm gây bệnh trên cam của chủng xạ khuẩn XK1 phân lập từ đất trồng cam.

Trần Bảo Trâm, Nguyễn Thị Hiền, Trần Bình Minh, Nguyễn Thị Thùy Linh, Hoàng Thị Vân Anh, Thái Hạnh Dung, Trần Văn Tuấn, Vũ Xuân Tạo

Đánh giá khả năng sản xuất của ba tổ hợp lai gà bố mẹ.

Phạm Thùy Linh, Nguyễn Quý Khiêm, Đặng Đình Tứ, Nguyễn Trọng Thiện, Lê Ngọc Tân, Đào Thị Bích Loan, Vũ Quốc Dũng, Lê Văn Hùng, Nguyễn Thị Thu Hiền, Nguyễn Duy Trang

Đa dạng thực vật cho lâm sản ngoài gỗ tại Khu bảo tồn thiên nhiên Đakrông, tỉnh Quảng Trị.

Lê Tuấn Anh, Trần Thị Hân, Phạm Thị Thúy Hoài, Hà Văn Bắc

Nghiên cứu tối ưu hóa công nghệ sấy cá lóc *Channa maculata* bằng phương pháp sấy phối hợp bơm nhiệt và bức xạ hồng ngoại.

Lê Thị Hồng Ánh, Dương Hồng Quân, Bùi Huy Chích, Hoàng Ngọc Cương, Lâm Thế Hải, Trần Quốc Đám, Đặng Xuân Cường, Nguyễn Thị Thảo Minh, Lê Hoàng Phượng, Đặng Văn Hải, Hoàng Thái Hà

Chuyển cấu trúc microRNA vào cây đậu nành (*Glycine max* (L.) Merr.) hạn chế sự ký sinh của tuyến trùng *Meloidogyne incognita*.

Nguyễn Vũ Phong, Hà Thị Trúc Mai, Đặng Lê Trâm, Nguyễn Thế Phương, Nguyễn Thị Ngọc Loan

1 Association between RAD51 gene polymorphism rs1801321 and ovarian cancer risk.

Nguyen Trong Nhan Le, Thu Thuy Nguyen, Quy Linh Nguyen, Van Khanh Tran, Huy Thinh Tran, Thanh Van Ta, Viet Tien Nguyen

6 Evaluating the anterior chamber depth and axis length in high myopia.

Thi Thu Hien Nguyen, Thi Minh Chau Pham

10 Analytical procedure for quality control of ^{18}F -Choline radiopharmaceutical.

Thanh Quang Vu, Ngoc Khoan Ha, Thanh Rin Bui, Trung Dung Nguyen, Tuan Linh Pham, Thi Hai Yen Nguyen, Thi Thu Hien Doan

17 Characteristics of the patient with hemodialysis from 26 hospitals in Hanoi by 2020.

Giang Hoang, Hong Son Trinh, Thi Kim Nhung Le, Thi Huyen Ngo, Thi Hong Van Vu, Duc Hung Tran, Duong Hung Nguyen, Van Thong Hoang, Tuan Anh Tran, Van Thanh Nguyen, Thanh Dat Nguyen, Ta Nam Vu, Huu Sam Nguyen, Trung Chinh Ha

22 Studying the anticancer activity *in vitro* of doxorubicin-encapsulated pH-sensitive redox nanoparticles.

Thi Hoang Nguyen, Nhu Thuy Trinh, Binh Long Vong

29 Process evaluation for simultaneous determination of Zidovudine and Lamivudine on the nanocarrier dendrimer by HPLC-PDA method.

Thi Thinh Nguyen, Cuu Khoa Nguyen

35 A study on the allelopathic activity and quantitative determination of total phenolic and flavonoid of six plants in the Asteraceae family.

Chi Nam Ngo, Khanh Linh Phan, Le Thi Ho

41 Studying on the antifungal activity of the actinomycete XK1 isolated from growing orange's soil against pathogenic fungi causing disease in citrus.

Bao Tram Tran, Thi Hien Nguyen, Binh Minh Tran, Thi Thuy Linh Nguyen, Thi Van Anh Hoang, Hanh Dung Thai, Van Tuan Tran, Xuan Tao Vu

46 Assessment of production capacity of three combinations of hybrid chickens.

Thuy Linh Pham, Quy Khiem Nguyen, Dinh Tu Dang, Trong Thien Nguyen, Ngoc Tan Le, Thi Bích Loan Dao, Quoc Dung Vu, Van Hung Le, Thi Thu Hien Nguyen, Duy Trang Nguyen

51 Diversity of non timber forest products (NTFPs) extracted from Dakrong nature reserve, Quang Tri province.

Tuan Anh Le, Thi Han Tran, Thi Thuy Hoai Pham, Van Bac Ha

55 Study on the drying condition optimisation of the heating pump and the infrared radiation for the snakehead fish *Channa maculata*.

Thi Hong Anh Le, Hong Quan Duong, Huy Chich Bui, Ngoc Cuong Hoang, The Hai Lam, Quoc Dam Tran, Xuan Cuong Dang, Thi Thao Minh Nguyen, Hoang Phuong Le, Van Hai Dang, Thai Ha Hoang

60 Transformation of an artificial microRNA to soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) to reduce the parasitism of *Meloidogyne incognita*.

Vu Phong Nguyen, Thi Truc Mai Ha, Le Tram Dang, The Phuong Nguyen, Thi Ngoc Loan Nguyen